

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL
N° d'ordre : D.U. 1672

UNIVERSITÉ D'Auvergne
Année 2006

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(Spécialité : Génétique Moléculaire)

Soutenue le 22 Septembre 2006

Isabelle VAILLANT

**ÉTUDE DES RÉGULATIONS GÉNÉTIQUES ET
ÉPIGÉNÉTIQUES DE L'EXPRESSION DES GÈNES
D'ARNr 5S CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA***

Président: Pr. Georges PICARD, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
Membres: Dr. Sylvette TOURMENTE, Université Blaise Pascal, Directrice de thèse
Rapporteurs : Dr. Valérie GAUDIN, INRA, Versailles
Dr. Thierry LAGRANGE, Université de Perpignan
Dr. Wen-Hui SHEN, IBMP, Strasbourg

U.M.R. C.N.R.S. GEEM BIOMOVE
24, Avenue des Landais 63177 Aubière cedex

Remerciements...

Merci à Valérie Gaudin, Thierry Lagrange, et Wen-Hui Shen, d'avoir accepté de juger ce travail et d'être venus jusqu'à Clermont-Ferrand pour assister à ma soutenance de thèse.

Merci à Georges Picard de m'avoir accueillie dans son laboratoire depuis mon DEA, de m'avoir permis de travailler à Biomove durant ces cinq ans, et d'avoir présidé mon jury de thèse. Merci à vous aussi, Georges, qui faites partie de ces quelques personnes qui m'ont donnée l'envie de faire de la recherche durant mes années d'études universitaires.

Merci à Sylvette, ma « chef », de m'avoir encadrée durant mon DEA et ma thèse, avec toujours cette bonne humeur qui te caractérise.

Merci à Vincent Colot de m'avoir accueillie dans son équipe et qui m'a permis de travailler avec Anne-Valérie Gendrel. Merci pour cette expérience enrichissante et merci Anne-Valérie pour ta spontanéité et ta sympathie.

Merci à Masahiro Sugiyura de m'avoir invitée à travailler avec Yasushi Yukawa durant un séjour à Nagoya qui fut intéressant aussi bien d'un point de vue scientifique que culturel.

Merci à Cécile et Marie-Noëlle, pour leurs « conseils protéiques » et leur disponibilité. Merci à Jacqueline pour sa sympathie et son implication dans nos recherches. Merci à Claudine, Marie-Claude et Nicole pour leur aide et leur bonne humeur.

Merci à Maryse et Marie-Joe pour leur jovialité et leur sympathie.

Merci à Jean-Marc D et à Thierry (mon « grand frère du labo ») pour nos discussions scientifiques et moins scientifiques ; merci Jean-Marc pour tes conseils et ta confiance.

Merci à Sophie, Jean-Yves, José-Luis, Nathalie, Laurent, Nicolas, pour ces jeudis soirs passés au billard au début de ma thèse. Merci aussi à Sébastien, Sophie F, Julien, Sophie W, Cyril, et Jean-Baptiste, pour les « animations » de ma soirée de thèse et nos « pauses labo ». Merci à Sam pour sa gentillesse et son humour. Merci à Kiomi pour nos discussions et ta gentillesse.

Merci à Milou et Nico, Théo et Fred, Nico B pour votre amitié.

Merci à ma juju LN et à Nico pour avoir si bien rempli ma vie durant (toutes) ces années d'études. Merci à Stéph, Nathalie, Hugo et Lucie. Merci à mes parents de

m'avoir permis de m'accomplir dans mes études et d'avoir toujours été présents à mes côtés.

Merci à Olivier, « mon collègue préféré », pour nos discussions scientifiques et d'avoir partagé ta passion avec moi, pour ton soutien de tous les jours au laboratoire. Merci à Olivier d'être à mes côtés dans notre vie hors laboratoire, quoiqu'il arrive.

Sommaire

Résumé et Abstract	1
Liste des illustrations.....	2

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Introduction	4

Chapitre I-L'ARN ribosomique 5S	5
1. L'ARNr 5S est un composant des ribosomes	6
2. L'ARNr 5S forme différents complexes ribonucléoprotéiques	7
3. Fonction de l'ARNr 5S.....	9
4. Organisation et structure des gènes codant les ARNr 5S.....	9
4.1 Organisation des gènes codant les ARNr 5S chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
4.2 Structure des gènes d'ARNr 5S	11
4.2.1 Le promoteur interne.....	11
4.2.2 Importance de la région en amont du site de transcription.....	12
4.2.3 Terminaison de transcription	13
5. La machinerie transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S	13
5.1 Le facteur de transcription TFIIIA	14
5.2 Le facteur de transcription TFIIIC	15
5.3 Le facteur de transcription TFIIIB	16
6. Régulation différentielle des familles de gènes d'ARNr 5S chez <i>Xenopus</i>	17
6.1 Facteurs de transcription et expression différentielle des gènes 5S.....	18
6.2 La chromatine est un régulateur à part entière de la transcription 5S.....	18
7. Transcription des gènes d'ARNr 5S chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
8. Méthylation des gènes d'ARNr 5S et transcription.....	21

Chapitre II-Épigénétique, méthylation de l'ADN et ARN interférence	23
1. Différentes méthylations de l'ADN	24
2. La méthylation des cytosines chez les eucaryotes	24
3. Les ADN méthyltransférases	25
3.1 MET1/DNMT1	25
3.1.1 MET1 : méthylase de maintenance et/ou <i>de novo</i> ?	26
3.2 CMT3.....	27
3.3 « Domains Rearranged Methyltransferases »	28
4. DDM1	30
5. Déméthylation de l'ADN : DEMETER et ROS1	31

6. Phénomènes de TGS	33
<u>6.1 Les mutants et les cibles du TGS</u>	34
6.1.1 Transgènes	34
6.1.2 Séquences endogènes	34
6.1.3 Les gènes inactivés dans des mutants de TGS	35
<u>6.2 Gènes impliqués dans l'inactivation des gènes sans changement de la méthylation ADN</u>	36
6.2.1 La protéine MOM1	36
6.2.2 Les protéines BRU1 et CAF-1	37
6.2.3 La protéine RPA2	38
7. PTGS et ARN interférence	38
<u>7.1 siRNA</u>	39
<u>7.2 miRNA</u>	40
8. Petits ARN et « silencing » nucléaire	40
<u>8.1 RdDM</u>	40
<u>8.2 RNAi et hétérochromatine</u>	42
9. La polymérase IV	43
 Chapitre III-Modifications post-traductionnelles des histones	45
1. Acétylation/déacétylation des histones	46
2. Méthylation de l'ADN et déacétylation des histones	47
3. Méthylation des histones	48
4. Méthylation des histones/méthylation ADN	50
5. Méthylation ADN/méthylation et acétylation des histones	51
 OBJECTIFS DE LA THÈSE	53
 RÉSULTATS DES TRAVAUX DE THÈSE	55
Article n°1: « Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from <i>Arabidopsis thaliana</i> »	56
Etude d'un produit d'épissage alternatif de TFIIIA : TFIIIAbis	68
Article n°2: « Changes in 5S rDNA Chromatin Organization and Transcription during Heterochromatin Establishment in <i>Arabidopsis</i> »	76
Article n°3: « MOM1 mediates DNA methylation-independent silencing of repetitive sequences in <i>Arabidopsis</i> »	90
Résultats supplémentaires	116

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	119
1. Les facteurs TFIIIA et TFIIIBis	120
2. Impact de la structure de la chromatine sur l'expression des gènes d'ARNr 5S	123
3. Découverte d'un nouveau type de transcrit provenant des gènes d'ARNr 5S	125
4. « Silencing » dans le double mutant <i>met1cmt3</i>	126
5. Impact de MOM1 sur l'expression des séquences répétées hétérochromatiques	127
6. Perspectives de travail.....	128

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
--	-----

ANNEXE	171
---------------------	-----

Article n°4: « Epigenetic mechanisms are involved in the transcriptional regulation of 5S ribosomal DNA in <i>Arabidopsis thaliana</i> »	172
---	-----

Résumé

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes d'ARNr 5S, transcrits par l'ARN polymérase III, sont présents à environ 1000 copies regroupées en blocs situés au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique des chromosomes 3, 4 et 5. Le chromosome 5 porte un locus d'ADNr 5S sur chacun de ses bras. Seuls les loci du chromosome 4 et du bras gauche du chromosome 5 contiennent des gènes d'ARNr 5S transcrits. La population d'ARNr 5S est hétérogène chez *Arabidopsis* et se caractérise par la présence d'un ARNr 5S dit « majoritaire », représentant plus de 90% des transcrits 5S de la cellule, et d'ARNr 5S « minoritaires » différant du transcrit 5S majoritaire par une ou deux substitutions nucléotidiques. Dans le cadre de l'étude de la régulation génétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S, nous avons identifié, cloné et caractérisé TFIIIA d'*Arabidopsis*, qui est le facteur de transcription spécifique des gènes d'ARNr 5S. Lors de cette étude, nous avons également identifié un produit d'épissage alternatif du gène *TFIIIA*, codant une protéine plus courte que TFIIIA dans sa partie N-terminale, dénommée TFIIIAbis. L'analyse de lignées RNAi ciblant TFIIIAbis et des expériences de transcription *in vitro*, ont suggéré que TFIIIAbis aurait un effet positif sur le taux global des ARNr 5S, probablement en stabilisant ces ARN. Nous avons également mené une étude de la régulation épigénétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S. Ainsi, nous avons démontré l'implication de la méthylation de l'ADN dans la répression de la transcription des gènes d'ARNr 5S minoritaires. L'expression de ces gènes est également contrôlée par la voie de répression transcriptionnelle indépendante de la méthylation ADN dont MOM1 fait partie. Nous avons identifié un nouveau type de transcrits provenant des gènes d'ARNr 5S, appelés ARNr 5S-210. De la même façon que les ARNr 5S minoritaires, l'expression des ARNr 5S-210 est contrôlée par la méthylation de l'ADN et par la voie de répression contenant MOM1. Enfin, nous montrons que toutes les séquences répétées hétérochromatiques, à l'exception des éléments transposables, sont soumises à ces deux voies de répression.

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, polymerase III-transcribed 5S rRNA genes are present at about 1000 copies clustered at pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5. The chromosome 5 bears one 5S rDNA locus on each arm. Transcribed 5S rRNA genes are only present on chromosome 4 and in the large locus of left arm of chromosome 5. In *Arabidopsis*, 5S rRNA pool is heterogeneous and characterized by the existence of both a major 5S rRNA (more than 90% of total 5S rRNAs) and some minor 5S rRNAs, differing from the major one by one or two base substitutions. Within the framework of the study of the genetic regulation of the 5S rDNA expression, we have identified, cloned and characterized the transcription factor TFIIIA from *Arabidopsis* that is specific of the 5S genes. We also identified an alternatively spliced product from the *TFIIIA* gene, named TFIIIAbis, that is shorter than TFIIIA in its N-terminal extremity. The data obtained by the targeting of TFIIIAbis by a RNAi technique and *in vitro* transcription experiments, suggest a positive effect of TFIIIAbis on the 5S rRNA global rate, probably by stabilizing these RNA. We also studied the epigenetic regulation of the 5S rDNA demonstrating the implication of DNA methylation in the silencing of minor 5S genes. In addition, MOM1 mediates DNA methylation-independent silencing of these genes. We identified a novel transcript originating from 5S genes, named 5S-210 rRNA. As minor 5S rRNA, the expression of the 5S-210 transcripts is under the control of DNA methylation and of the MOM1 pathway. Finally, we demonstrated that all highly repetitive heterochromatic sequences with the exception of transposable elements are controlled by these two distinct epigenetic silencing pathways.

Liste des illustrations

Figures

- 1 : Composition d'un ribosome procaryote et d'un ribosome eucaryote
- 2 : L'ARNr 5S forme différents complexes chez le xénope
- 3 : Structure secondaire de l'ARNr 5S chez les eucaryotes et chez les procaryotes
- 4 : Représentation schématique des chromosomes d'*Arabidopsis thaliana* dans les écotypes Columbia et Landsberg *erecta*
- 5 : Représentation schématique de deux unités d'ADNr 5S consécutives
- 6 : Séquences consensus des différents loci d'ADNr 5S d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia
- 7 : Interactions des facteurs de transcription sur le gène d'ARNr 5S chez *S. cerevisiae*
- 8 : Structure des gènes d'ARNr 5S de type ovocytaire et somatique chez le xénope
- 9 : Les ARNr 5S proviennent uniquement du chromosome 4 et du grand locus du chromosome 5
- 10 : Modèle de régulation de l'imprinting de *MEDEA*
- 11 : Modèle des activités biochimiques de ROS1
- 12 : Silencing post-transcriptionnelle via les siRNA et les miRNA
- 13 : « RNA-directed DNA methylation » (RdDM)
- 14 : Epissage alternatif de TFIIA
- 15 : RT-PCR de TFIIA et TFIIB dans différents types cellulaires
- 16 : Expériences de retards sur gel de TFIIB-GST
- 17 : Localisation cellulaire de TFIIB
- 18 : Transcription *in vitro*
- 19 : Le RNAi de TFIIB entraîne des phénotypes au niveau des plantes
- 20 : Taux global d'ARNr 5S des plantes transformantes
- 21 : Méthylation de l'ADNr 5S
- 22 : Taux global d'ARNr 5S

Tableaux

- 1 : Composition et équivalences des facteurs de transcription généraux polymérase III chez *S. cerevisiae* et chez l'humain
- 2 : Principales ADN méthyltransférases chez *Arabidopsis*
- 3 : Différentes méthylations euchromatiques et hétérochromatiques des histones H3 et H4 chez les mammifères, la drosophile et *Arabidopsis*
- 4 : Proportion d'ARNr 5S minoritaires

Synthèse Bibliographique

Introduction

Le terme « hétérochromatine » est largement utilisé pour désigner des régions de la chromatine condensées ou contenant des gènes dont l'expression est réprimée (phénomène appelé dans cette thèse « silencing »). A l'origine l'hétérochromatine a été décrite comme des segments de chromosomes ou des chromosomes qui restent condensés pendant l'interphase et qui se colorent différemment du reste du noyau (l'euchromatine) (Heitz, 1928). Depuis sa première description, d'autres caractéristiques ont été attribuées à l'hétérochromatine (Henikoff, 2000; Hennig, 1999; Karpen and Allshire, 1997). D'un point de vue cytologique, ce sont des régions chromosomiques colorées intensément et hautement condensées, et moléculairement, ce sont des segments de chromosomes contenant des séquences d'ADN répétées en tandem. Biochimiquement, l'hétérochromatine est un complexe d'ADN et de protéines relativement insensible à la DNase I, et est riche en ADN méthylé et en histones H3 méthylées sur leur lysine 9. De manière physique, les nucléosomes sont arrangés régulièrement au niveau de l'hétérochromatine, et fonctionnellement, ce sont des régions largement inactives transcriptionnellement, se répliquant tardivement, et étant rarement impliquées dans la recombinaison méiotique.

L'objectif de ces travaux de thèse était d'approfondir la compréhension de la régulation de l'expression des gènes d'ARNr 5S, d'un point de vue génétique et épigénétique. Les gènes d'ARNr 5S étant situés dans l'hétérochromatine péracentromérique chez *Arabidopsis*, la synthèse bibliographique se déclinera en trois chapitres : le premier chapitre présente notre modèle d'étude, l'ARNr 5S ; le deuxième chapitre décrit la méthylation de l'ADN et son impact sur l'expression des gènes ; le troisième chapitre présente certaines modifications post-traductionnelles des histones qui participent au contrôle de l'expression du génome.

Chapitre I

L'ARN ribosomique 5S

1. L'ARNr 5S est un composant des ribosomes

La synthèse des protéines utilisant les ARNm comme matrice est un processus universel. Il n'est donc pas surprenant que la machinerie cellulaire nécessaire à la synthèse protéique soit hautement conservée. L'ensemble des événements de la synthèse protéique sont possibles grâce à un complexe multienzymatique important, composé de molécules protéiques et de molécules d'ARN : le ribosome. Ce dernier établit des interactions spécifiques avec l'ARNm à traduire, des ARNt portant les acides aminés et différents cofacteurs protéiques assurant ainsi la formation correcte de la chaîne polypeptidique. Des bactéries jusqu'aux mammifères, les ribosomes possèdent globalement la même structure. Ce sont de grosses particules ribonucléoprotéiques qui sont invariablement constituées d'une grande et d'une petite sous-unité. Cependant, les ribosomes eucaryotes (ribosomes 80S) et procaryotes (ribosomes 70S) ont une composition différente en ARN et en protéines (figure 1). Chez les eucaryotes, la petite sous-unité 40S est composée d'une molécule d'ARN ribosomal 18S liée à 33 protéines ribosomales différentes, alors que la grande sous-unité 60S est constituée de trois molécules d'ARN ribosomales, 28S (25S chez les plantes), 5.8S et 5S, qui sont liées à environ 50 protéines ribosomales. Les ribosomes procaryotes sont légèrement plus petits et contiennent moins de composants. La petite sous-unité 30S contient un ARNr 16S et 21 protéines alors que la grande sous-unité 50S possède un ARNr 23S et un ARNr 5S ainsi que 31 protéines. Les interactions entre l'ARNm et les ARNt ont lieu au sein de la petite sous-unité ribosomale alors que la grande sous-unité permet l'assemblage de la chaîne peptidique. D'autre part, comme décrit précédemment, les ribosomes étant composés d'ARN ribosomiques et de protéines ribosomales, leur biogenèse fait intervenir trois ARN polymérases dans les cellules eucaryotes: l'ARN polymérase I transcrit les ARNr 28S (25S chez les plantes), 18S et 5.8S, l'ARN polymérase II synthétise les ARNm codant les protéines ribosomales et l'ARN polymérase III produit l'ARNr 5S. La majorité de ces différents facteurs est assemblée en particules pré ribosomales dans le nucléole, puis ces particules traversent le nucléoplasme, sortent du noyau par les pores nucléaires et sont finalement assemblées en ribosomes matures dans le cytoplasme. En plus des trois ARN polymérases, un très grand nombre de protéines non ribosomales et de petits ARN nucléolaires catalysent la formation des ribosomes et restent dans le nucléole quand les sous-unités ribosomales sont exportées vers le cytoplasme (Warner, 2001).

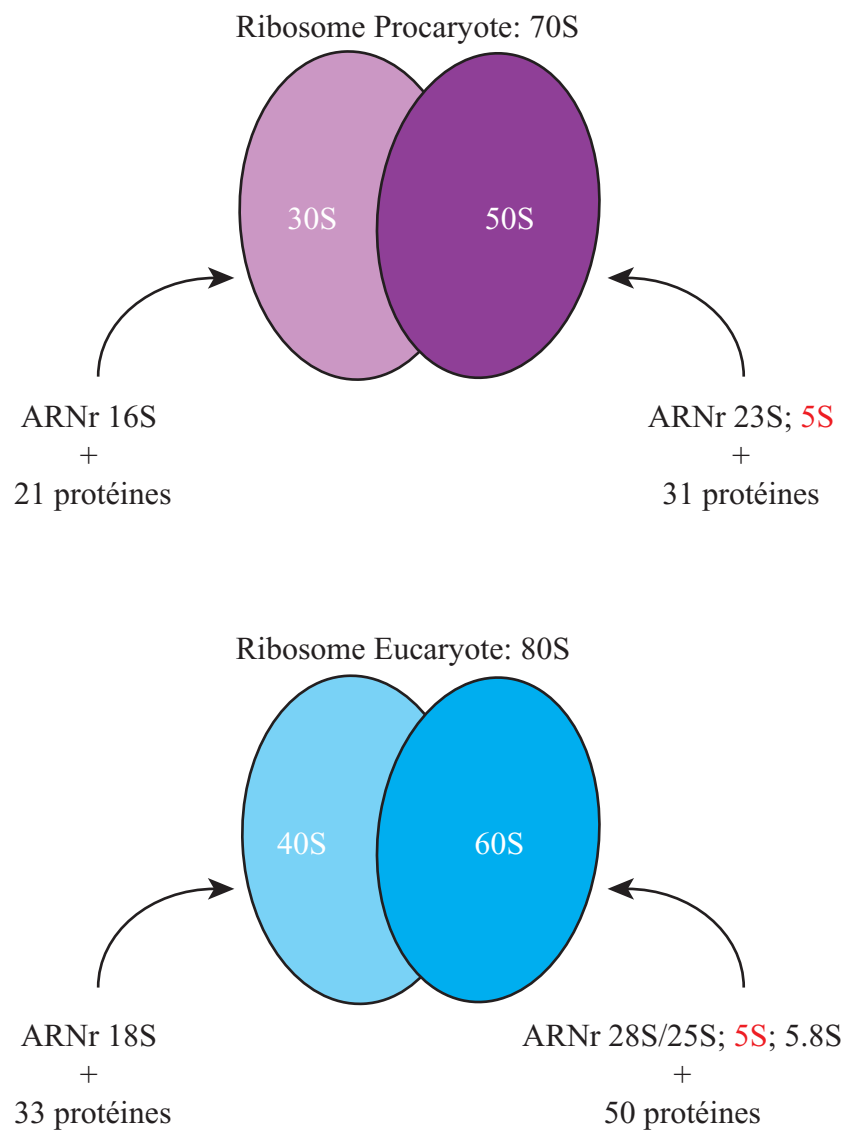


Figure 1: Composition d'un ribosome procaryote et d'un ribosome eucaryote.

2. L'ARNr 5S forme différents complexes ribonucléoprotéiques

Les différents complexes prenant en charge l'ARNr 5S sont résumés figure 2.

L'ARNr 5S possède la particularité de pouvoir être lié par son propre facteur de transcription spécifique TFIIIA (voir paragraphe 5.1). TFIIIA a de multiples fonctions dans la biogenèse des ribosomes. Durant les stades précoces de l'ovogenèse chez le xénope, TFIIIA active la transcription de larges quantités d'ARNr 5S avant que les autres composants ribosomiques ne soient disponibles. L'excès d'ARNr 5S est exporté jusqu'au cytoplasme en étant lié soit à TFIIIA, formant le complexe ribonucléoprotéique 7S (7S RNP ; (Honda and Roeder, 1980 ; Pelham and Brown, 1980; Picard and Wegnez, 1979)), soit à la protéine L5, constituant le complexe ribonucléoprotéique 5S (5S RNP ; (Allison et al., 1991; Guddat et al., 1990)). Ces ARNr 5S sont alors stockés à ce niveau jusqu'au moment de l'assemblage des ribosomes qui a lieu pendant les stades tardifs de l'ovogenèse. En générant des variants d'ARNr 5S ne pouvant lier ni L5, ni TFIIIA, Guddat et al. ont observé que ces ARN sont retenus dans le noyau démontrant ainsi l'importance de ces liaisons dans l'export des ARNr 5S (Guddat et al., 1990). Avec le début de l'assemblage des ribosomes, les ARNr 5S doivent être réimportés dans le noyau pour être incorporés dans la grande sous-unité ribosomale. Contrairement à la 5S RNP, la 7S RNP ne peut pas être importée dans le noyau (Rudt and Pieler, 1996), elle reste séquestrée dans le cytoplasme certainement parce que la fonction d'import nucléaire de TFIIIA est masquée par la liaison de l'ARNr 5S (Pieler and Rudt, 1997). Rudt et Pieler ont montré que la liaison de l'ARNr 5S sur TFIIIA est un élément clé pour la rétention cytoplasmique de TFIIIA (Rudt and Pieler, 1996). A l'opposé, la capacité de l'ARNr 5S à être importé dans le noyau est corrélée avec sa capacité à lier la protéine ribosomale L5. Ainsi, la réentrée de l'ARNr 5S dans le noyau permet l'assemblage des ribosomes (Dechampesme et al., 1999; Steitz et al., 1988). La surexpression de la protéine L5 dans des embryons de xénope induit l'activation de gènes d'ARNr 5S normalement inactifs, permettant ainsi de supposer que la liaison de l'ARNr 5S à TFIIIA ou à L5 dans le cytoplasme serait un moyen de réguler indirectement la transcription des gènes d'ARNr 5S via la quantité de TFIIIA libre disponible pour la transcription (Pittman et al., 1999). Le stockage de l'ARNr 5S dans le cytoplasme n'est cependant pas un phénomène universel puisqu'il n'a pas été observé dans les cellules somatiques de mammifères (Rosorius et al., 2000).

En 1967, Knight et Darnell ont découvert que dans des cellules de mammifères seule la moitié des molécules ARNr 5S est associée avec la grande sous-unité du ribosome (Knight and Darnell, 1967). L'autre moitié est soit sous forme libre, soit associée avec une

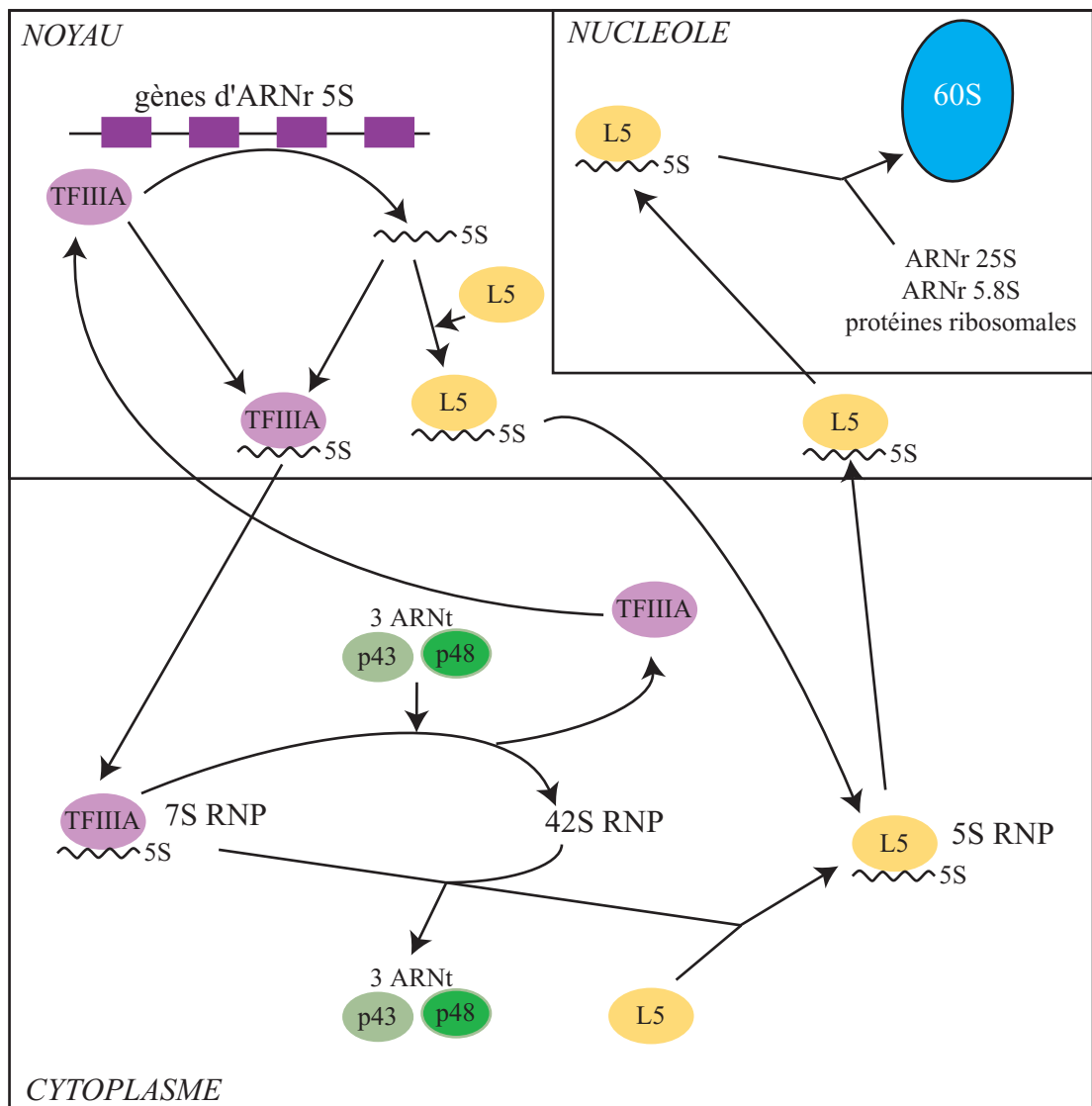


Figure 2: L'ARNr 5S forme différents complexes chez le xénope.

Chez les eucaryotes, les gènes d'ARNr 5S sont constitués d'unités indépendantes transcrites par la polymérase III. TFIIIA est impliqué dans l'initiation de la transcription et peut également lier l'ARNr 5S formant la 7S RNP qui peut être exportée du noyau au cytoplasme chez le xénope. L'ARNr 5S nouvellement synthétisé peut aussi être lié par L5 formant la 5S RNP qui peut amener l'ARNr 5S du noyau au cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, l'ARNr 5S peut être complexé en 42S RNP. L'ARNr 5S peut être importé dans le noyau mais uniquement sous forme 5S RNP, pour être incorporé à la grande sous-unité ribosomale 60S. D'après Szymanski et al. (2003).

ou plusieurs protéines. Une protéine de mammifères connue pour lier l'ARNr 5S est l'antigène La. Les ARN ainsi complexés représentent une petite fraction de l'ARNr 5S total, environ 1%, et sont légèrement plus longs au niveau de leur extrémité 3' (Rinke and Steitz, 1982). La protéine La permet en réalité la maturation de tous les transcrits polymérase III. Chez l'homme, la drosophile, *S. pombe*, *S. cerevisiae* et *T. brucei*, les différentes protéines La lient *in vivo* les transcrits polymérase III nouvellement synthétisés (Wolin and Cedervall, 2002). De même chez *Xenopus*, Guddat et al. ont montré que les ARNr 5S nucléaires nouvellement synthétisés interagissent de manière transitoire avec l'antigène La (Guddat et al., 1990). De plus, des expériences de protection à la ribonucléase sur des pré-ARNr 5S immunoprécipités de xénope ont révélé que la protéine La protège l'extrémité 3' de ces ARN de digestions exonucléasiques (Shi et al., 1996). La protéine La est par la suite remplacée soit par la protéine L5 soit par TFIIA. D'autre part dans les cellules de mammifères, les 5S RNP (ARNr 5S lié à L5) serviraient de précurseurs à l'assemblage du ribosome en permettant le passage de l'ARNr 5S du nucléoplasme au lieu d'assemblage des sous-unités préribosomales 60S dans le nucléole (Steitz et al., 1988). Ces auteurs proposent donc une voie en trois étapes pour l'assemblage des ARNr 5S dans les ribosomes : les ARNr 5S nouvellement synthétisés non maturés sont complexés avec la protéine La, une fois ces ARN maturés ils s'associent avec la protéine L5 qui adresse les ARN jusqu'au nucléole pour qu'ils puissent être intégrés dans la grande sous-unité ribosomale.

Chez *Xenopus*, l'ARNr 5S est retrouvé également dans la particule 42S. Malgré le fait que la particule 42S ait été la première RNP non-ribosomale contenant l'ARNr 5S décrite dans des ovocytes immatures de *X. laevis* (Ford, 1971), elle a été relativement peu étudiée. Environ 50% des ARNr 5S présents dans ces ovocytes immatures sont retrouvés dans les particules 42S. Ce sont des structures relativement complexes comportant quatre sous-unités 15S identiques (Denis and le Maire, 1983; Kloetzel et al., 1981). Chaque sous-unité contient l'ARNr 5S, des ARNt, la protéine p43 et la protéine p48 dans les ratios molaires 1:3:1:2, respectivement (Picard et al., 1980). C'est en fait la protéine p43 qui lie l'ARNr 5S dans ce complexe. Cette protéine est structurellement similaire à TFIIA mais ces deux protéines sont fonctionnellement différentes ; en effet p43 ne lie pas les gènes codant les ARNr 5S mais exclusivement ses transcrits (Joho et al., 1990). La protéine p43 tient donc aussi un rôle de stockage cytoplasmique de l'ARNr 5S.

3. Fonction de l'ARNr 5S

Depuis de nombreuses années, l'ARNr 5S a été utilisé comme molécule modèle pour des études structurales des ARN et des analyses d'interactions ARN-protéines, mais aussi comme marqueur phylogénétique. Ceci a permis l'accumulation d'un grand nombre de séquences nucléotidiques de gènes d'ARNr 5S (Szymanski et al., 2002). La conservation des structures primaire et secondaire de cet ARN de 120 nucléotides entre procaryotes et eucaryotes suggère une fonction importante dans la biosynthèse des protéines (figure 3). Cependant, le rôle précis de l'ARNr 5S dans la fonction du ribosome n'est pas complètement élucidé. Basé sur des expériences de cross-linking, il a été suggéré qu'il pourrait servir de transducteur de signaux entre les différents domaines catalytiques du ribosome (Dokudovskaya et al., 1996), ou bien de déterminant de stabilité de la grande sous-unité ribosomale (Holmberg and Nygard, 2000). L'importance de la fonction de l'ARNr 5S dans la synthèse protéique a été démontrée chez *Escherichia coli*, où la délétion de six des huit gènes 5S présents réduit très fortement le taux de croissance de la bactérie (Ammons and Rampersad, 2001; Ammons et al., 1999).

Nous voyons donc que, bien que « l'acide ribosomal de faible poids moléculaire » ait été identifié voici 40 ans (Rosset and Monier, 1963), la fonction précise de l'ARNr 5S au sein du ribosome reste mal connue.

4. Organisation et structure des gènes codant les ARNr 5S

Les gènes d'ARNr 5S sont généralement présents sous la forme de blocs de séquences répétées en tandem en orientation directe. Le nombre de ces gènes est variable, pouvant aller de huit copies chez *E. coli* (Condon et al., 1995), à plusieurs centaines chez l'homme (Sorensen and Frederiksen, 1991) et *Drosophila melanogaster* (Wimber and Steffensen, 1970), voire près de 60000 chez *Linum usitatissimum* (Schneeberger et al., 1989). Les gènes d'ARNr 5S peuvent être regroupés en un seul locus ou bien dispersés dans le génome, selon les organismes. Chez les bactéries (Condon et al., 1995) et certains champignons comme *Saccharomyces cerevisiae* (Philippsen et al., 1978) ou *Mucor racemosus* (Cihlar and Sypherd, 1980), les gènes d'ARNr 5S sont retrouvés associés aux autres gènes d'ARNr, dans une même unité de transcription (chez les bactéries) ou transcrits indépendamment. Cependant, chez la plupart des eucaryotes supérieurs, et chez *Schizosaccharomyces pombe* (Mao et al., 1982) et *Neurospora crassa* (Selker et al., 1981), les gènes d'ARNr 5S ne sont pas physiquement liés aux autres gènes d'ARNr.

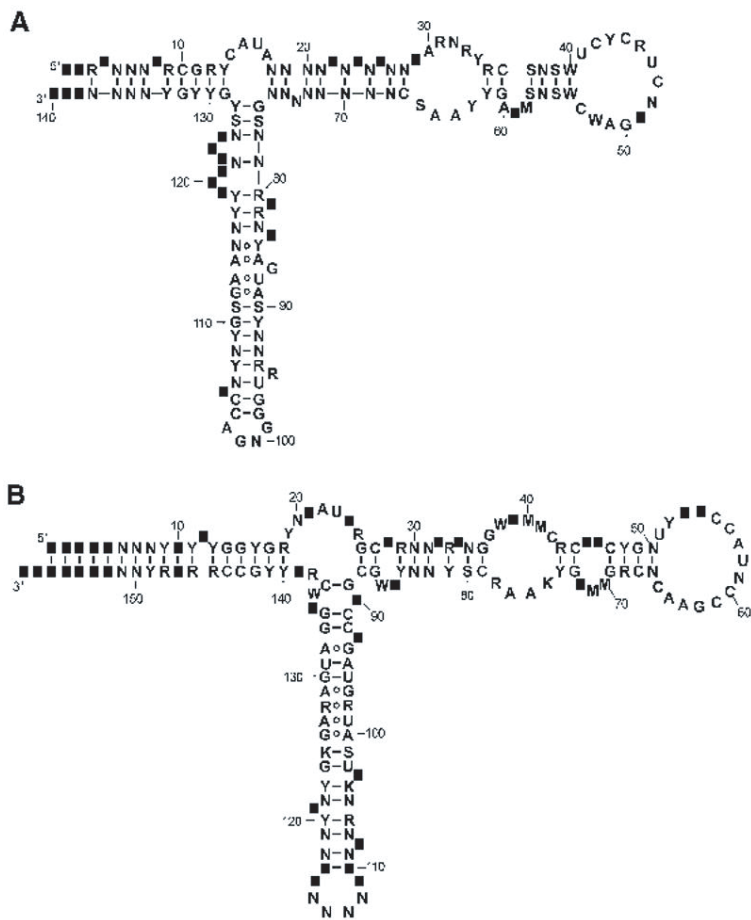


Figure 3: Structure secondaire de l'ARNr 5S chez les eucaryotes (A) et chez les procaryotes (B).

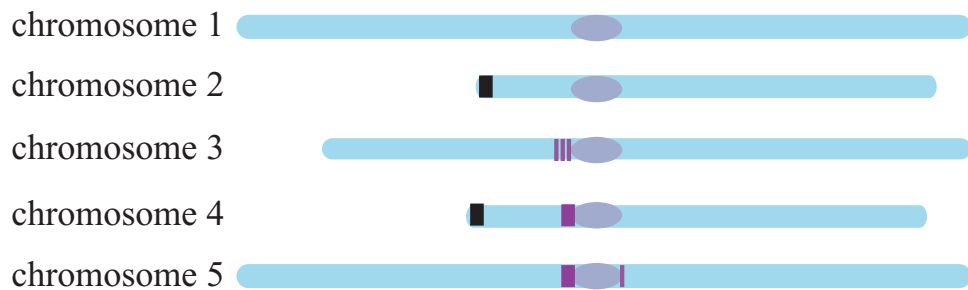
N: A, C, G ou U; Y: C ou U; R: A ou G; W: A ou U; S: G ou C; M: A ou C; K: G ou U. D'après Szymanski et al. (2002).

4.1 Organisation des gènes codant les ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

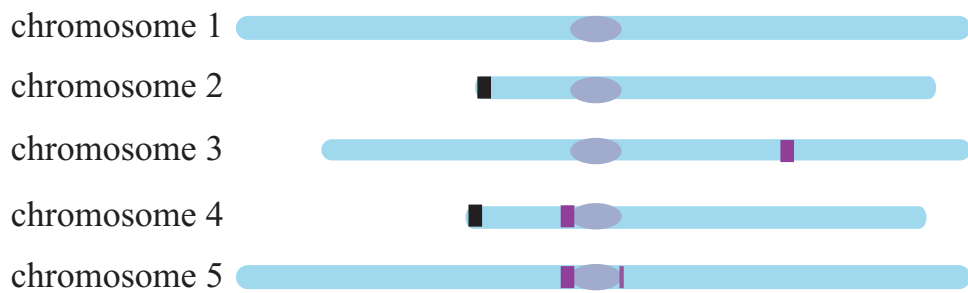
Arabidopsis thaliana possède environ 1000 gènes d'ARNr 5S par génome haploïde, organisés en blocs de répétitions en tandem, représentant 0,7% du génome (Campell et al., 1992). Grâce à des techniques d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes fluorescentes (FISH), à la fois sur chromosomes mitotiques et méiotiques, la répartition chromosomique de ces blocs d'ADNr 5S ainsi que le polymorphisme chromosomique de ces loci entre les différents écotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Fransz et al., 1998; Murata et al., 1997) ont pu être observés. Dans tous les écotypes testés, le chromosome 4 porte un bloc d'ADNr 5S sur son bras court et le chromosome 5 présente deux loci d'ADNr 5S ; un grand locus sur le bras gauche et un petit locus sur le bras droit du chromosome (Fransz et al., 1998; Murata et al., 1997). Tous ces blocs d'ADNr 5S se situent en position péracentromérique et sont de nature hétérochromatique, et ils sont physiquement séparés des loci des autres gènes d'ARNr qui sont localisés en position télomérique sur les bras courts des chromosomes 2 et 4 (figure 4). La présence ainsi que la position d'un bloc d'ADNr 5S sur le chromosome 3 sont polymorphiques entre certains écotypes (Fransz et al., 1998; Tutois et al., 2002). Par exemple dans les écotypes Columbia, Cape Verde Islands et Kashmir 1, ce locus 5S est retrouvé dans la région péracentromérique du bras court du chromosome, alors que dans le cas de l'écotype Landsberg *erecta* il se trouve au milieu du bras long du chromosome (figure 4). Dans les écotypes Landsberg, C24 et Wassileskija, le chromosome 3 ne porte pas de locus d'ADNr 5S (Fransz et al., 1998).

La cartographie de chromosomes artificiels de levure (YAC, Yeast Artificial Chromosome) et de chromosomes artificiels de bactéries (BAC, Bacteria Artificial Chromosome) au niveau des différents loci génomiques d'ADNr 5S a été réalisée (AGI, 2000; Cloix et al., 2000; Tutois et al., 1999). Afin d'étudier la nature des gènes d'ARNr 5S présents au niveau des différents loci génomiques, ces YAC ont été utilisés comme matrice ADN pour des amplifications PCR utilisant des amorces établies selon la séquence du gène d'ARNr 5S initialement rapportée par Campell et al. (Campell et al., 1992). La séquence des produits PCR obtenus a permis d'établir de nouvelles séquences consensus de gènes d'ARNr 5S spécifiques de chacun des différents loci génomiques d'ADNr 5S (Cloix et al., 2000).

De plus, ces réactions PCR ont révélé l'existence de deux types de gène d'ARNr 5S dans l'écotype Columbia. Les unités représentées majoritairement ont une longueur de 502 pb et plus rarement des variants de 251 pb sont retrouvés. Ces derniers, présentant une



Arabidopsis thaliana écotype Columbia



Arabidopsis thaliana écotype Landsberg erecta

Figure 4: Représentation schématique des chromosomes d'*Arabidopsis thaliana* dans les écotypes Columbia et Landsberg erecta.

Les loci d'ADNr 5S et les loci d'ADNr sont représentés par les rectangles violets et noirs, respectivement; les centromères sont visualisés par des élipSES grises.

délétion couvrant une partie de la séquence transcrite des gènes d'ARNr 5S de 502 pb, ont uniquement été détectés au niveau du petit locus du chromosome 5 (Cloix et al., 2000).

4.2 Structure des gènes d'ARNr 5S

Les gènes d'ARNr 5S sont composés d'une région transcrite de 120 pb, contenant des séquences promotrices internes utilisées pour la transcription par l'ARN polymérase III, séparées par des séquences espaceurs, considérées auparavant comme non transcrites, portant également certains motifs de séquences importants pour la transcription.

4.2.1 Le promoteur interne

La caractéristique la plus étonnante et la plus inhabituelle des promoteurs utilisés par la polymérase III est que la majorité des éléments de séquence requis pour la transcription est située en aval du site d'initiation de transcription (+1). Ces régions de contrôle internes à la séquence transcrite sont généralement discontinues et composées de blocs séparés par des régions non-essentiels. Les gènes d'ARNr 5S somatiques (décrits dans la section 6) chez *X. laevis* sont un exemple classique qui requiert trois éléments internes pour une transcription efficace : une boîte A localisée entre les positions +50 et +64, un élément intermédiaire positionné entre +67 et +72, et une boîte C qui s'étend de +80 à +97 (Pieler et al., 1987) (figure 5). Ces trois éléments composent l'ICR, pour « internal control region » ; il est suffisant pour permettre l'assemblage du complexe de transcription composé de l'ARN polymérase III et de trois facteurs de transcription TFIIA, TFIIB et TFIIC. De plus, ce promoteur est relativement sensible à des changements d'espacements entre ses trois éléments (Pieler et al., 1987). Ce type de région de contrôle interne est aussi retrouvé dans les gènes d'ARNr 5S de beaucoup d'organismes inférieurs parmi lesquels *Drosophila melanogaster* (Sharp and Garcia, 1988) et *S. cerevisiae* (Lee et al., 1995), ainsi que chez les mammifères (Seifart et al., 1989).

Par analogie de séquence avec les données disponibles chez *Xenopus laevis* (Bogenhagen et al., 1980; Pieler et al., 1987; Sakonju et al., 1980), les éléments constituant le promoteur interne des gènes d'ARNr 5S d'*Arabidopsis thaliana* ont pu être définis. La boîte A se situe entre les positions +51 et +62 par rapport au site d'initiation de transcription, l'élément intermédiaire est formé des paires de bases +71 et +72, et la boîte C est comprise entre les positions +81 et +90 (Cloix et al., 2000).

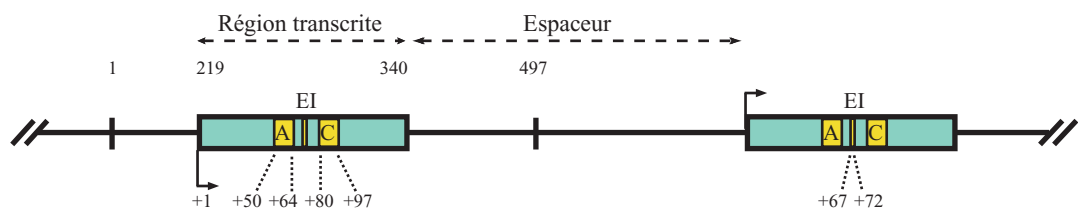


Figure 5 : Représentation schématique de deux unités d'ADNr 5S consécutives. La région transcrite et l'espaceur intergénique sont indiqués. Le promoteur est interne à la région transcrite et est composé des boîtes A et C et d'un élément intermédiaire noté EI.

4.2.2 Importance de la région en amont du site de transcription

Les tous premiers travaux effectués sur un gène somatique codant un ARNr 5S chez le xénope ont montré que le remplacement de la région entière flanquante en 5' par l'ADN plasmidique d'*E. coli* (pMB9) n'avait aucun effet sur la transcription dans des extraits nucléaires d'ovocytes de *Xenopus* (Bogenhagen et al., 1980; Sakonju et al., 1980). En revanche, les séquences flanquantes en 5' des gènes d'ARNr 5S chez *Bombyx mori* sont essentielles à la transcription utilisant des extraits cellulaires homologues (Morton and Sprague, 1984). Ces auteurs ont montré qu'une région de 26 pb en amont de la séquence transcrite du gène d'ARNr 5S est nécessaire à une transcription efficace *in vitro*. La séquence de cette région contient un motif TATAT, ressemblant à une boîte TATA (« TATA-like »).

Toutefois, bien que les régions amont des gènes d'ARNr 5S chez *Xenopus laevis* ne représentent pas un élément nécessaire à la transcription *in vitro*, ces séquences sont impliquées dans l'établissement de structures chromatiques distinctes qui contribuent à l'expression différentielle des gènes d'ARNr 5S de type ovocytaire et somatique (Wolffe, 1994). De plus, ces séquences sont requises pour une initiation précise de la transcription par l'ARN polymérase III.

L'importance de la région amont dans la transcription des gènes d'ARNr 5S a, par la suite, été également démontrée chez différents organismes. En effet, les gènes d'ARNr 5S chez *Caenorhabditis elegans* et *Caenorhabditis briggsae* (Nelson et al., 1998), *Neurospora crassa* (Selker et al., 1986) et *Drosophila melanogaster* (Sharp and Garcia, 1988) possèdent la même séquence « TATA-like » que les gènes d'ARNr 5S de *Bombyx mori* (Morton and Sprague, 1984) et cette séquence est requise pour une transcription efficace par l'ARN polymérase III. Paradoxalement, chez *Acanthamoeba castellanii*, la substitution d'une séquence consensus TATA dans la région 5' d'un gène codant l'ARNr 5S provoque des effets modestes sur la transcription (Peng and Bateman, 2004). Chez les mammifères, la séquence « TATA-like » est remplacée par une séquence de 12 pb riche en G+C appelée boîte D et située aux environs de la position -30 en amont de la région transcrite des gènes d'ARNr 5S (Hallenberg et al., 1994; Hart and Folk, 1982; Jensen and Frederiksen, 2000; Nielsen et al., 1993). Cette séquence est nécessaire à une transcription efficace des gènes d'ARNr 5S de mammifères *in vitro* (Hallenberg et al., 1994; Nielsen et al., 1993).

Chez *Arabidopsis thaliana*, comme dans le cas des séquences promotrices internes, les éléments régulateurs en 5' de la région transcrite ont été définis par homologie de séquence. Une étude en transcription *in vitro* utilisant des extraits nucléaires de tabac a

montré qu'un motif « TATA-like » (de séquence TATATA) en position -28, un dinucléotide GC en -12 et un résidu C en -1 sont nécessaires à une transcription précise et efficace des gènes d'ARNr 5S d'*Arabidopsis* (Cloix et al., 2003). Cette étude a également confirmé la position et l'importance du promoteur interne à la séquence transcrite de ces gènes.

4.2.3 Terminaison de transcription

Une séquence consensus simple présente en aval de la séquence transcrite des gènes d'ARNr 5S, composée d'un cluster d'au moins quatre résidus T, agit comme un signal de terminaison de transcription chez le xénope (Bogenhagen and Brown, 1981). De même, chez *Acanthamoeba castellanii*, des analyses de délétions ont permis de montrer l'importance d'une région T-riche pour la terminaison de transcription (Peng and Bateman, 2004). *In vitro*, il a été également montré que l'ARN polymérase III termine la transcription d'un gène codant l'ARNr 5S de souris au niveau d'un cluster de 23 résidus A (Emerson and Roeder, 1984).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe également un stretch de T en aval de la région transcrite du gène d'ARNr 5S (figure 6). Cette séquence diffère entre les unités d'ADNr 5S suivant qu'elles appartiennent aux loci du chromosome 3, du chromosome 4, au grand ou au petit locus du chromosome 5 (Cloix et al., 2000; Cloix et al., 2002). Par exemple, les unités du chromosome 4 possèdent un long stretch de T ininterrompu (de 19 à 21 résidus), alors que la séquence polydT des gènes d'ARNr 5S aux autres loci est interrompue par des motifs qui sont spécifiques de chaque locus (figure 6). Cloix et al. ont montré par des expériences *in vitro* que cette séquence est aussi utilisée comme terminateur de transcription par l'ARN polymérase III (Cloix et al., 2003).

5. La machinerie transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S

Les ARN polymérases I et III eucaryotes transcrivent un nombre limité de gènes. La polymérase I synthétise les ARNr, alors que la polymérase III produit les ARNr 5S, les ARNt, l'ARN 7SL, l'ARNsn U6 et quelques autres petits ARN dont la plupart est impliquée dans des processus de maturation. Ceci contraste avec la vaste variété des transcrits polymérase II qui codent les protéines. Cependant, les activités polymérases I et III dominent la transcription cellulaire puisqu'elles génèrent plus de 80% des ARN transcrits dans des cellules en croissance.

L'expression des gènes d'ARNr 5S nécessite trois facteurs de transcription, TFIIA, TFIIB et TFIIC. La plupart des informations disponibles sur la transcription des gènes

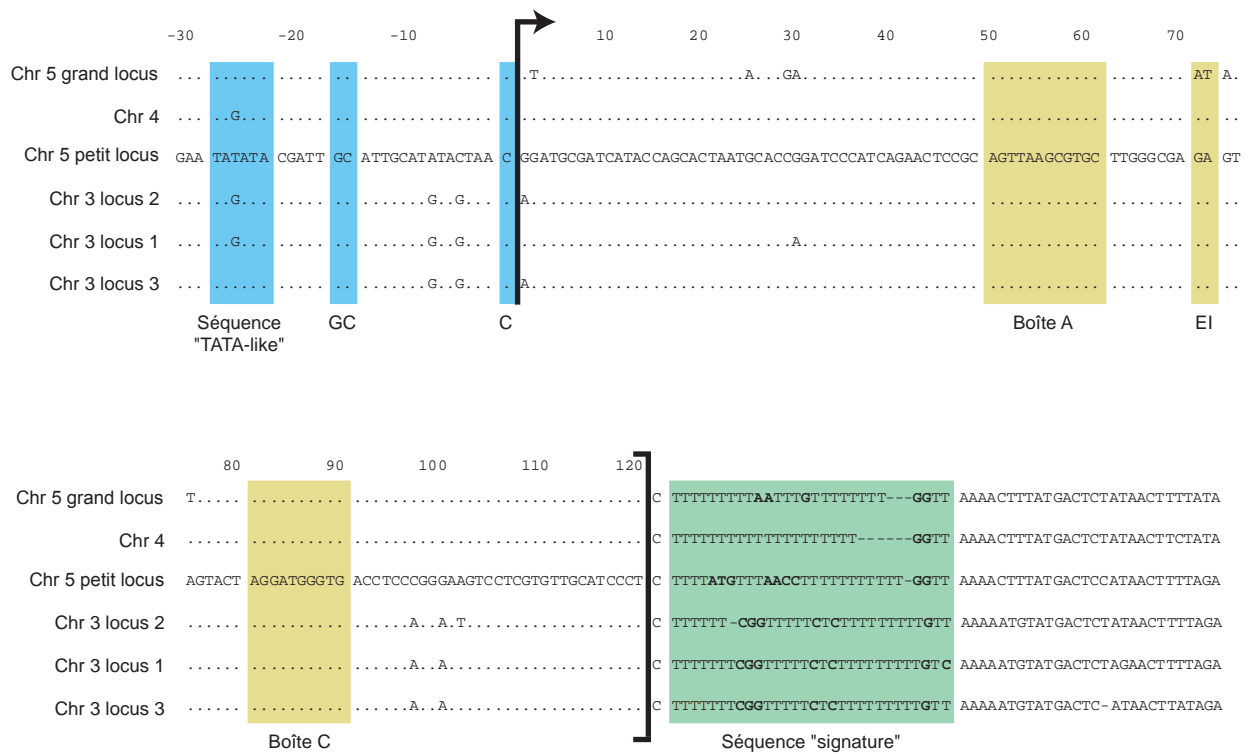


Figure 6: Séquences consensus des différents loci d'ADNr 5S d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia.

Les séquences promotrices externes sont entourées en bleu et les séquences composant le promoteur interne (ICR) sont entourées en jaune. Les séquences "signature" (en vert) sont constituées d'une répétition de résidus T dont la longueur et les motifs qui l'interrompent sont spécifiques à chaque locus. EI : Élément Intermédiaire, Chr : Chromosome. (Mathieu, 2003a)

d'ARNr 5S provient des nombreux travaux effectués chez *Xenopus laevis* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les trois facteurs de transcription se fixent sur le promoteur de manière séquentielle ; TFIID contacte les trois éléments du promoteur interne, puis TFIIC se lie à TFIID permettant ainsi la fixation de TFIIIB en amont du site d'initiation de la transcription, ce dernier facteur recrutant l'ARN polymérase III (Bieker et al., 1985; Kassavetis et al., 1990; Setzer and Brown, 1985) (figure 7).

5.1 Le facteur de transcription TFIID

TFIID a la particularité d'être le facteur de transcription spécifique des gènes d'ARNr 5S. TFIID de *X. laevis*, d'environ 38.6 kDa, fut le premier facteur de transcription eucaryote à être purifié (Engelke et al., 1980) et le premier dont le cDNA a été cloné (Ginsberg et al., 1984). C'est également le membre fondateur de la famille des protéines à doigts de zinc ; en effet, cette protéine de 344 acides aminés contient neuf doigts de zinc de type Cys₂-His₂, qui sont des domaines de liaison à l'ADN zinc-dépendants (Miller et al., 1985). Un domaine contenu dans l'extrémité C-terminale de la protéine est nécessaire à l'activation transcriptionnelle des gènes d'ARNr 5S (Mao and Darby, 1993). Les doigts 1 à 3 N-terminaux reconnaissent la boîte C du promoteur interne d'un gène 5S, la liaison de ces trois domaines à la boîte C représentant environ 95% de l'énergie de liaison totale de la protéine TFIID entière sur le gène 5S (Clemens et al., 1992; Foster et al., 1997; Nolte et al., 1998). Les doigts 7 à 9 C-terminaux contactent la boîte A mais avec une moindre affinité (Clemens et al., 1992). En revanche, les doigts 4 à 6 adoptent une structure particulière qui leur permet de couvrir l'ADN interbloc (entre les boîtes A et C) qui est deux fois plus long que l'ADN lié par les doigts N-terminaux (1-3) ou C-terminaux (7-9) (Nolte et al., 1998). Seul le doigt 5 se positionne au niveau de l'élément intermédiaire se trouvant entre les boîtes A et C (Nolte et al., 1998).

Depuis sa caractérisation chez *Xenopus laevis*, TFIID a été identifié dans plusieurs organismes incluant d'autres espèces d'amphibiens (Gaskins and Hanas, 1990; Gaskins et al., 1992), l'homme (Drew et al., 1995), le poisson chat (Ogilvie and Hanas, 1997), la souris et le rat (Hanas et al., 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Archambault et al., 1992), *Schizosaccharomyces pombe* (Schulman and Setzer, 2002), et *Acanthamoeba castellanii* (Polakowski and Paule, 2002).

Chez les plantes, TFIID de maïs (Wyszko et al., 1997) et TFIID de tulipe (Wyszko and Barciszewska, 1997) ont été isolés uniquement biochimiquement. L'identification et la caractérisation de TFIID d'*Arabidopsis*, le seul caractérisé chez les plantes, sera décrite

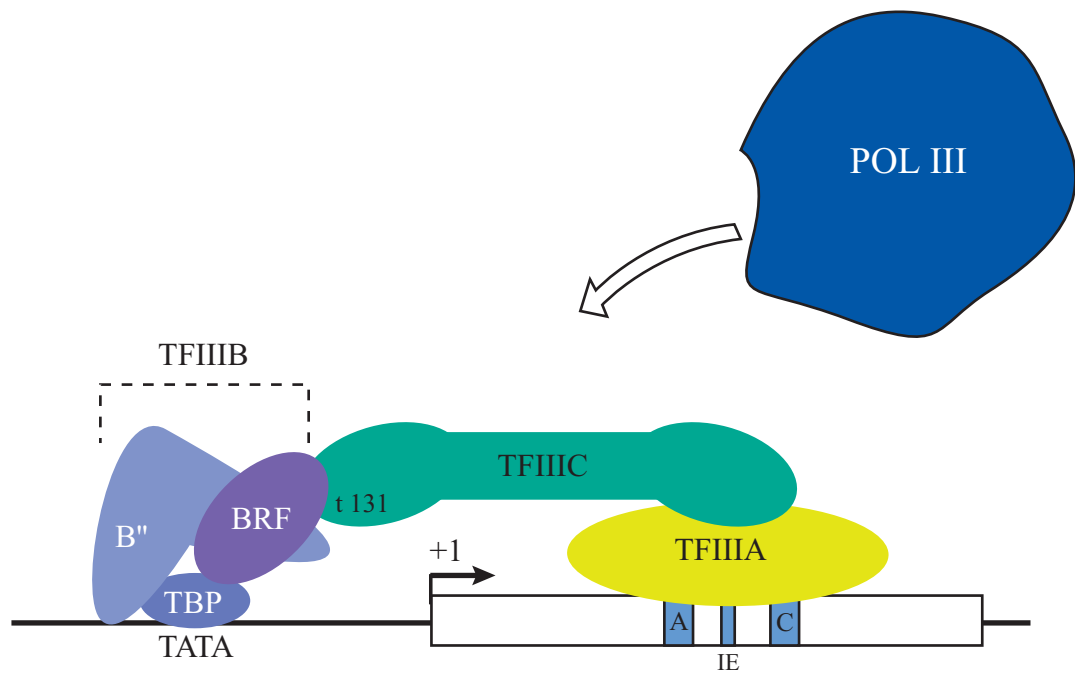


Figure 7 : Interactions des facteurs de transcription sur le gène d'ARNr 5S chez *S. cerevisiae*.

TFIIIC se place sur le promoteur grâce à des contacts avec TFIIIA qui est positionné sur le promoteur interne (boîtes A et C et l'élément intermédiaire IE). L'extrémité N-terminale de la sous-unité t 131 de TFIIC lie la partie N-terminale de BRF, alors que la partie C-terminale de BRF contacte à la fois TBP et B''. TFIIB est composé de B'' + TBP + BRF.

dans la partie résultats de cette thèse. L'analyse de la séquence de ces différents TFIIIA révèle une très faible conservation de la séquence primaire. Ainsi, les protéines TFIIIA de *Xenopus laevis* et *Saccharomyces cerevisiae* partagent moins de 20% d'identité, et la plupart des résidus conservés se situe au niveau des doigts de zinc. De manière surprenante, même entre les différentes espèces d'amphibiens, la divergence est considérable, TFIIIA de *X. laevis* possédant 84% d'identité de séquence avec TFIIIA de *X. borealis*, et 63% avec TFIIIA de *Rana catesbeiana* (Paule and White, 2000). Au cours de l'évolution, le taux de divergence entre les différents TFIIIA est très élevé s'il est comparé à celui d'autres protéines à doigt de zinc, à d'autres facteurs de transcription ou aux protéines en général (Schulman and Setzer, 2002). La divergence des différents TFIIIA est d'autant plus surprenante que les sites des gènes d'ARNr 5S liés par ces protéines sont fortement conservés (Szymanski et al., 2002).

Malgré ces variations de séquence primaire, les protéines TFIIIA connues possèdent une organisation similaire à celle de TFIIIA de *X. laevis*, à l'exception des TFIIIA de *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Les doigts de zinc 8 et 9 sont séparés par une longue région espaceur de 81 acides aminés chez *S. cerevisiae* (Archambault et al., 1992) et la protéine TFIIIA de *S. pombe* contient un dixième doigt de zinc (Schulman and Setzer, 2002).

Comme vu précédemment (section 2), il a été montré que la protéine TFIIIA est capable de lier le gène d'ARNr 5S ainsi que l'ARNr 5S (Picard and Wegnez, 1979; Polakowski and Paule, 2002; Wyszko and Barciszewska, 1997; Wyszko et al., 1997). Par sa liaison aux transcrits 5S, TFIIIA permet leur transport et /ou leur stockage.

5.2 Le facteur de transcription TFIIIC

TFIIIA sert d'adaptateur à TFIIIC, lui permettant ainsi d'être recruté au niveau des gènes d'ARNr 5S pour qui il possède peu d'affinité. Contrairement à TFIIIA, TFIIIC est composé de plusieurs polypeptides ; TFIIIC est un des plus complexes et des plus gros facteurs de transcription connus. Chez *Xenopus laevis*, une protéine TFIIIC native de 400 kDa a été purifiée et une seule sous-unité de 85 kDa a été identifiée (Keller et al., 1992). Chez *S. cerevisiae*, TFIIIC est composé de six sous-unités (tableau 1 ; (Paule and White, 2000)). Aucune de ces sous-unités considérée séparément, ne semble capable de lier l'ADNr 5S (Conesa et al., 1993; Parsons and Weil, 1990; Parsons and Weil, 1992). Chez l'homme, TFIIIC est également constitué de plusieurs sous-unités séparées fonctionnellement en sous-complexes : TFIIIC1 d'environ 200 kDa composé d'au moins quatre sous-unités (Wang and Roeder, 1998), TFIIIC2 formé par cinq polypeptides et TFIIIC0 liant la région de

<i>S. cerevisiae</i>	Homme
TFIIIA	TFIIIA
TFIIIB: TBP+BRF+B"	TFIIIB: TBP+BRF+B"
TFIIIC	TFIIIC
<div> <div> <div>τ 138</div> <div>τ 131</div> <div>τ 95</div> <div>τ 91</div> <div>τ 60</div> <div>τ 55</div> </div> <div> <div>-----</div> <div>-----</div> <div>-----</div> <div>-----</div> <div>-----</div> <div>-----</div> </div> <div> <div>TFIIIC 220</div> <div>TFIIIC 102</div> <div>TFIIIC 63</div> <div>TFIIIC 110</div> <div></div> <div></div> </div> </div>	<div> <div>TFIIIC 220</div> <div>TFIIIC 102</div> <div>TFIIIC 63</div> <div>TFIIIC 110</div> <div></div> <div></div> </div> <div> <div>TFIIIC 90</div> <div>TFIIIC1</div> <div>TFIIIC0</div> </div>

Tableau 1: Composition et équivalences des facteurs de transcription généraux polymérase III chez *S. cerevisiae* et chez l'humain.

terminaison des gènes (tableau 1 ; (Oettel et al., 1997; Paule and White, 2000)). TFIIC1 renforce la liaison de TFIIC2 sur l'ADN et est requis pour la transcription (Huang and Maraia, 2001). TFIIC humain (hTFIIC) lève la répression nucléosomale *in vitro* grâce à l'activité histone acétyl-transférase de trois sous-unités de TFIIC2 (hTFIIC220, hTFIIC110 et hTFIIC90) qui acétylent les histones H3, H4, H2A (Kundu et al., 1999). hTFIIC90, cloné et caractérisé par Hsieh et al., possède une activité acétyl-transférase spécifique des histones H3 (Hsieh et al., 1999).

TFIIC est un coactivateur puisqu'il fait le lien entre la protéine TFIIIA, qui lie spécifiquement l'ADNr 5S, et le complexe protéique qui est reconnu par l'ARN polymérase III, TFIIB.

5.3 Le facteur de transcription TFIIB

TFIIB est composé de trois sous-unités : une TBP (pour « TATA binding protein »), une TAF90 (pour « TBP-associated factor 90 », appelée aussi B''), et une TAF70 (aussi connue sous le nom de BRF pour « TFIIB-related factor) (tableau 1). TFIIB est recruté en 5' du site d'initiation de la transcription grâce à des contacts protéine-protéine par TFIIC/TFIIIA/ADNr 5S (Paule and White, 2000). Des expériences de délétion au niveau de B'' chez la levure ont montré que TFIIB participe en deux étapes à l'ouverture du promoteur par l'ARN polymérase III. En effet, B'' permet l'initiation de la séparation des brins d'ADN à l'extrémité amont de la bulle de transcription, et BRF permet sa propagation (Kassavetis et al., 2001). Une fois que TFIIB est positionné en amont du site de la transcription, TFIIIA et TFIIC ne sont plus indispensables à la transcription par la polymérase III *in vitro* (figure 7 ; (Kassavetis et al., 2001)). La TBP stabilise la liaison de BRF sur TFIIC, et ces deux sous-unités sont requises pour l'assemblage de B'' (TAF90) dans le complexe de transcription, et pour la transcription spécifique par l'ARN polymérase III (Kassavetis et al., 1992; Sharp, 1992).

Chez l'homme, en 1995 Wang et Roeder ont purifié à partir de TFIIB, un polypeptide de 90 kDa (hTFIIB90) et ont isolé l'ADNc correspondant (Wang and Roeder, 1995). Des expériences de complémentation ont permis à ces auteurs de conclure que hTFIIB90 est l'homologue fonctionnel de TAF70 de *S. cerevisiae*, c'est-à-dire de BRF. En réalité, tout comme chez la levure, hTFIIB est formé par hTBP, hBRF et hB'' (tableau 1 ; (Huang and Maraia, 2001)). La partie C-terminale de hTBP possède deux répétitions directes liant la boîte TATA (Nikolov et al., 1996). D'ailleurs, phylogénétiquement, la

portion C-terminale de TBP est conservée chez la levure, *Arabidopsis thaliana* et chez l'homme (Nikolov et al., 1996).

Chez *C. elegans*, une protéine de 759 aa homologue à BRF a été identifiée par Larminie et White (Larminie and White, 1998). Chez *Arabidopsis thaliana*, TFIIB n'a pas été isolé mais deux gènes codant deux TBP de 200 aa sont connus (Gasch et al., 1990) et il existe une séquence prédite de BRF dans les banques de données. De plus, l'activité de liaison à l'ADN de TBP a permis d'isoler TFIIB chez *X. laevis* (McBryant et al., 1996).

6. Régulation différentielle des familles de gènes d'ARNr 5S chez *Xenopus*

L'ovocyte de xénope, durant son développement, accumule des réserves d'ARNr 5S ainsi que d'autres ARNr et des facteurs de transcription et de traduction, en préparation des multiples divisions cellulaires rapides et successives qui auront lieu sans transcription immédiatement après la fécondation (Wolffe and Brown, 1988). De premières études ont suggéré que ces ARNr 5S sont codés par une famille multigénique extrêmement active durant l'ovogenèse mais inactivée après la fécondation (Brown and Littna, 1964; Brown and Weber, 1968). D'autres expériences ont depuis montré que les ARNr 5S proviennent de deux familles multigéniques étroitement liées ; environ 20000 gènes de type ovocytaire et environ 400 gènes de type somatique par génome haploïde (Peterson et al., 1980). Les deux familles sont exprimées durant l'ovogenèse et les stades précoces de développement mais les gènes de type ovocytaire deviennent sélectivement réprimés de sorte que les gènes somatiques produisent 95% des ARNr 5S dans les cellules somatiques (Denis et al., 1972; Ford and Southern, 1973; Wegnez et al., 1972). Ceci implique que les gènes somatiques sont 1000 fois plus activement transcrits que les gènes ovocytaires dans les tissus somatiques (Wolffe and Brown, 1988).

Chaque copie des gènes ovocytaires a une taille variant de 650 à 850 pb mais contient de manière invariable un gène et un pseudogène séparés par une séquence espaceur riche en A+T. Chaque copie de gène d'ARNr 5S de type somatique fait 880 pb et est formée d'un gène et d'un espaceur riche en G+C (figure 8). Les séquences transcrites de ces deux types de gènes ont une longueur identique de 120 pb et diffèrent uniquement à 5 positions nucléotidiques. Ces positions différentes sont importantes pour la fixation des facteurs de transcription. Les séquences espaceurs partagent quant à elles peu ou pas d'homologie ; elles jouent un rôle dans l'établissement de structures chromatiniennes distinctes importantes pour l'expression différentielle des deux types de gènes.

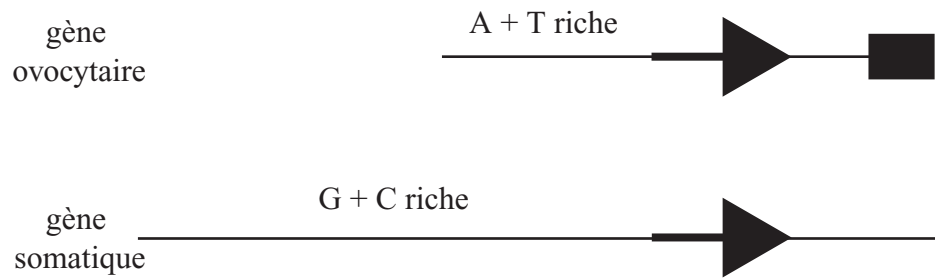


Figure 8: Structure des gènes d'ARNr 5S de types ovocytaire et somatique chez le xénope.

Les séquences transcrites sont représentées par les flèches et le rectangle noir représente un pseudogène. D'après Wolffe (1994).

6.1 Facteurs de transcription et expression différentielle des gènes 5S

Comme vu précédemment, la transcription 5S est régulée via la séquence promotrice interne à la séquence transcrite (ICR) (Sakonju et al., 1980). De manière intéressante, les mêmes facteurs sont impliqués dans l'expression des gènes ovocytaires et somatiques, et ces deux types de gènes, dont l'ICR, sont très similaires (Bopenhagen et al., 1982; Peterson et al., 1980). Le facteur de transcription spécifique des gènes 5S, TFIIA, se lie au promoteur interne, et permet la formation d'un complexe de préinitiation stable (Lassar et al., 1983). Bien que TFIIA contacte les deux types de gènes avec la même affinité, l'abondance relative de ce facteur dans les cellules suit l'activité des gènes de type ovocytaire *in vivo* (Ginsberg et al., 1984). La majorité de l'ARNr 5S est synthétisée précocement durant l'ovogenèse, quand TFIIA est très abondant et que l'activité TFIIC est également en excès (Korn, 1982). Ces facteurs de transcription deviennent par la suite limitants pour la transcription dans l'oeuf et l'embryon. Il faut souligner que même si le complexe de transcription est formé au niveau de la séquence transcrite elle-même, le complexe n'est pas affecté par plusieurs cycles de synthèse d'ARNr 5S (Bopenhagen et al., 1982), mais est déplacé par la fourche de réplication (Wolffe and Brown, 1986). Il a été suggéré que la stabilité du complexe de transcription doit être critique pour l'expression sélective des gènes somatiques dans les tissus somatiques (Schlissel and Brown, 1984; Wolffe and Brown, 1988). La liaison de TFIIC stabilise grandement le complexe ADN/TFIIA de sorte qu'en conditions de faible abondance de TFIIA, l'expression des gènes somatiques pourrait être favorisé *in vivo* (Lassar et al., 1983; Wolffe, 1988). De plus, certaines mutations au niveau du promoteur peuvent résulter en une transcription réduite sans diminuer de manière détectable la liaison de TFIIA (Pieler et al., 1987), et les quelques différences de bases entre les gènes de type ovocytaire et somatique résultent en une moindre stabilisation de TFIIC sur le premier type (Wolffe and Brown, 1988). Ces résultats suggèrent que TFIIC pourrait établir des interactions spécifiques avec les boîtes A et C de l'ICR.

6.2 La chromatine est un régulateur à part entière de la transcription 5S

Comme vu dans le paragraphe précédent, le contrôle différentiel de l'expression des gènes 5S ovocytaires et somatiques est relié à la stabilité du complexe de préinitiation assemblé sur ceux-ci (Bopenhagen et al., 1982; Darby et al., 1988; Wormington et al., 1981). En fait, l'investigation de l'influence de la chromatine sur la transcription 5S est aisée car la chromatine des ovocytes immatures et des œufs fertilisés de xénope retient les facteurs nécessaires à la transcription ou à la répression (Bopenhagen et al., 1982; Parker and

Roeder, 1977). Par exemple, alors que les complexes de transcription assemblés sur les gènes somatiques sont stables en présence d'un excès de compétiteur ADNr 5S, ceux assemblés sur les gènes ovocytaires sont déplacés (Wormington et al., 1981). Ces complexes « somatiques » ont été montrés stables *in vivo* pendant plusieurs semaines dans des cellules ne se répliquant pas (Darby et al., 1988). Des résultats *in vitro* ont aussi suggéré que la stabilité du complexe de transcription 5S est un facteur critique de la régulation des gènes 5S et qu'une compétition entre l'assemblage de la chromatine et l'assemblage de complexes de transcription stables existe. Dans des extraits d'ovocytes et d'œufs de *Xenopus* qui permettent à la fois l'assemblage de la chromatine et la transcription 5S, des expériences *in vivo* et *in vitro* ont suggéré que l'assemblage de la chromatine entrerait en compétition avec les facteurs de transcription au niveau des régions régulatrices (Almouzni et al., 1990; Almouzni et al., 1991; Shimamura et al., 1988). Par l'utilisation d'enzymes de restriction pour étudier le positionnement des nucléosomes, Morse a montré que les nucléosomes reconstitués avec des histones purifiées inhibent à la fois l'initiation et l'élongation de l'ARN polymérase III de xénope (Morse, 1989). De même, dans un système *in vitro* de levure, l'assemblage d'un complexe de transcription complet est réfractaire à la répression par l'assemblage ultérieur de la chromatine (Felts et al., 1990).

Des études ont indiqué que les histones linker (H1) jouent également un rôle important dans la régulation de l'expression différentielle 5S dépendante de la structure chromatinienne chez *Xenopus*. L'histone H1 n'est pas présente dans les oeufs de xénope (Dimitrov et al., 1993; Hock et al., 1993; Wolffe, 1989). A sa place une autre histone « linker » est présente, l'histone B4, qui est exprimée uniquement dans les ovocytes (Smith et al., 1988). L'ARNm de l'histone H1 est bien synthétisé dans l'ovocyte mais il est stocké sous une forme « masquée », c'est à dire associée à des protéines empêchant sa traduction (Bouvet and Wolffe, 1994). Ce n'est qu'après la fécondation que l'ARNm de H1 sera traduit (Woodland et al., 1979). Pendant l'embryogenèse précoce, l'histone H1 s'accumule, en corrélation directe avec la répression des gènes d'ADNr 5S ovocytaires (Dimitrov et al., 1993; Wolffe, 1989). Dans des cellules somatiques, les gènes ovocytaires réprimés sont assemblés dans des structures chromatinienne répressives impliquant l'histone H1, alors que les gènes somatiques sont assemblés dans des complexes de transcription productifs (Schlissel and Brown, 1984). Des expériences de digestion à la DNase micrococcale ont permis d'établir que la fixation de H1 sur les deux types de gènes a des conséquences différentes. Ainsi, la fixation de H1 sur les gènes ovocytaires positionne le nucléosome de manière à rendre les gènes (notamment la boîte C du promoteur interne) inaccessibles au

complexe de transcription, alors que sur les gènes somatiques, le positionnement du nucléosome, induit par la fixation de H1, laisse les éléments du promoteur accessibles et les gènes compétents pour la transcription (Sera and Wolffe, 1998).

7. Transcription des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*

Comme vu au paragraphe 4.1, au laboratoire, des séquences issues de produits PCR utilisant comme matrice des YAC cartographiés au niveau des différents loci 5S d'*Arabidopsis thaliana*, ont permis d'établir des signatures spécifiques pour les gènes d'ARNr 5S appartenant à tel ou tel locus ((Cloix et al., 2002) ; figure 6). L'équipe s'est intéressée à l'étude de l'expression de ces différents gènes car il a été depuis longtemps suggéré que seule une partie des gènes 5S doit être active. En effet, le nombre important de gènes 5S excède largement le nombre qui devrait être requis pour produire un taux amplement suffisant d'ARNr 5S. Ainsi, par des expériences de RT-PCR, à différents stades de développement et dans différents tissus, il a été observé que les ARNr 5S sont de différentes natures. L'ARNr 5S dit majoritaire est l'ARN retrouvé de façon prépondérante, représentant plus de 90% des transcrits 5S retrouvés dans la cellule. Des ARNr 5S dits minoritaires représentent la deuxième population d'ARNr 5S : ils diffèrent du majoritaire par la substitution d'une ou de deux bases (Cloix et al., 2002). De plus, ces deux types d'ARNr 5S sont également retrouvés au niveau des ribosomes (Cloix et al., 2002). Ceci peut être interprété de différentes manières : (i) les ribosomes portant un ARNr 5S minoritaire ne sont pas fonctionnels ; (ii) il existe une hétérogénéité fonctionnelle des sous-unités ribosomales 60S ; (iii) les substitutions de bases trouvées au niveau des ARNr 5S minoritaires ne modifient pas leur fonction. En fait, l'hétérogénéité des transcrits 5S a été rapportée chez de nombreux organismes dont les bactéries (Jarry and Rosset, 1971), les champignons (Chen et al., 1984; Wildeman and Nazar, 1982), les échinodermes (Lu et al., 1980), les arthropodes (Komiya et al., 1980) et les amphibiens (Ford and Southern, 1973).

Des expériences de RT-PCR ainsi que de transcription *in vitro* ont permis de montrer que seuls certains gènes d'ARNr 5S localisés au niveau du chromosome 4 et du grand locus du chromosome 5 ont la capacité à être transcrits. La présence de différentes mutations au niveau du promoteur interne des gènes appartenant aux loci du chromosome 3 et au petit locus du chromosome 5 seraient responsables de l'inhibition de l'expression de ces gènes, qu'elle traduise une réelle non transcription ou une dégradation très rapide des ARN produits (figure 9 ; (Cloix et al., 2002; Cloix et al., 2003)). En comparant les séquences des produits des RT-PCR avec les séquences des gènes d'ARNr 5S provenant des PCR réalisées

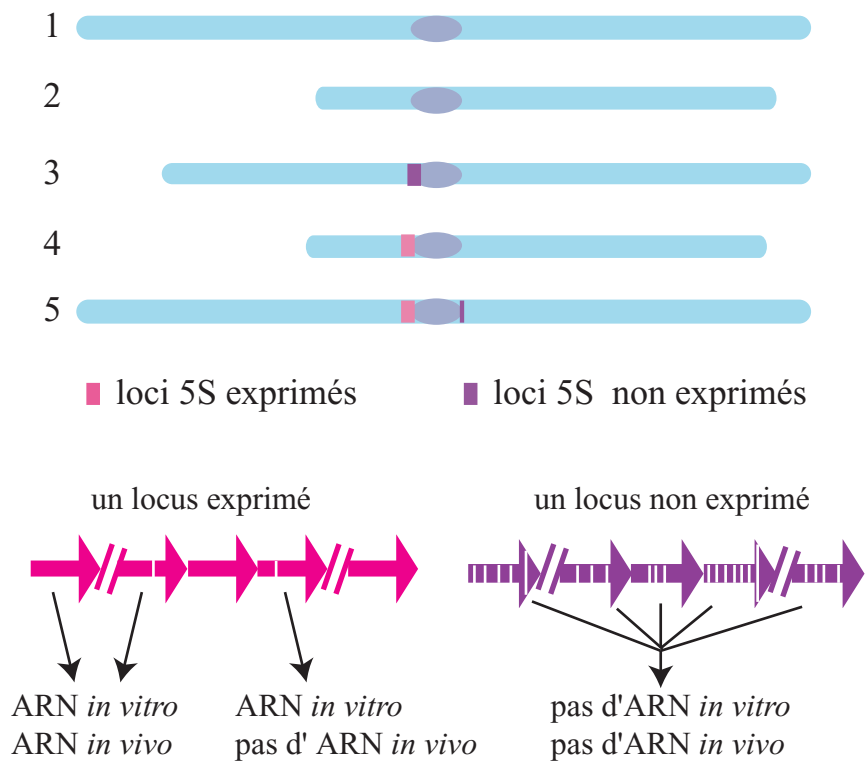


Figure 9: Les ARNr 5S proviennent uniquement du chromosomes 4 et du grand locus du chromosome 5. Chaque flèche rose ou violette représente une unité ADNr 5S; chaque trait blanc visualise une substitution dans l'unité ADNr 5S.

sur les différents YAC portant les loci génomiques d'ADNr 5S, l'équipe s'est aperçue qu'effectivement seuls le locus du chromosome 4 et le grand locus du chromosome 5 portent des gènes dont la séquence transcrite correspond aux ARNr 5S majoritaires et minoritaires. D'autre part, des ARN correspondant à des gènes d'ARNr 5S ayant la capacité à être transcrits (possédant une séquence promotrice interne intacte) n'ont jamais été isolés *in vivo*, alors que leur transcription *in vitro* est efficace (figure 9). Ainsi, le produit d'un gène portant une substitution nucléotidique en position +98 (un T au lieu d'un G) n'a jamais été retrouvé par RT-PCR alors que ce gène possède au moins 20 copies dans le génome. Deux hypothèses peuvent être avancées : soit ces gènes sont transcrits à un faible niveau indétectable par RT-PCR, soit les produits de ces gènes sont rapidement dégradés. Olivier Mathieu, lors d'un séjour dans le laboratoire du Professeur Sugiura au Japon, a pu montrer par des expériences *in vitro* que ce type de gènes possède une transcription et une stabilité équivalentes à un gène majoritaire (Mathieu, 2003). La conclusion de ces expériences fut que l'expression de ces gènes est très certainement inactivée par des phénomènes épigénétiques. L'ADN de séquences « silencées » épigénétiquement, est souvent méthylé.

8. Méthylation des gènes d'ARNr 5S et transcription

L'ADNr 5S a surtout été étudié chez les plantes. L'utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation a permis de mettre en évidence que l'ADNr 5S est méthylé chez le maïs (Mascia et al., 1981), le blé (Grellet and Penon, 1984), le lupin (Rafalski et al., 1982), le pois (Ellis et al., 1988), le lin (Goldsbrough et al., 1982), le soja (Gottlob-McHugh et al., 1990), le tabac (Fulnecek et al., 1998; Kovarik et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Finnegan et al., 1996; Vongs et al., 1993) et chez le thé (Singh and Ahuja, 2006). Chez *X. laevis*, le même type d'analyses a montré que les gènes 5S somatiques et ovocytaires sont fortement méthylés (Sims et al., 1983).

L'impact de la méthylation de l'ADN sur la transcription par l'ARN polymérase III a été analysé pour deux types de gènes transcrits par cette polymérase : un gène d'ARNt^{lys2} de poulet et deux gènes d'ARNr 5S de xénope, de type ovocytaire et somatique (Besser et al., 1990). L'ADN de ces gènes a été méthylé artificiellement à l'aide d'une méthyltransférase extraite à partir de foie de rat, méthylant spécifiquement les cytosines en contexte CG, puis injecté dans des ovocytes de xénope. Les auteurs ont observé que si la méthylation entraîne une diminution du taux de transcription du gène d'ARNt^{lys2} d'environ 80% par rapport à un contrôle non-méthylé, elle n'affecte pas le taux de transcription des gènes d'ARNr 5S

ovocytaires et somatiques. Ces résultats suggèrent que la méthylation de l'ADN a un impact différent sur la transcription des gènes transcrits par l'ARN polymérase III.

L'étude de l'influence de la méthylation ADN sur la transcription des ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana* a été amorcée au laboratoire par Olivier Mathieu. Ainsi, il a pu montrer que l'ADNr 5S est fortement méthylé sur les cytosines (79,1% en moyenne) et ce quelque soit le contexte, c'est-à-dire en contextes symétriques (CG et CNG) et asymétriques (Mathieu et al., 2002). Cette forte méthylation de l'ADN est présente sur tous les loci 5S, qu'ils soient transcrits ou non. Les profils de méthylation de gènes d'ARNr 5S correspondant à des ARNr 5S et les profils de méthylation de gènes pour lesquels il n'a jamais été trouvé d'ARN alors qu'ils sont transcrits et stables *in vitro* (voir paragraphe 7), ont été comparés. Aucune différence particulière n'a été relevée ; leur taux global de méthylation est similaire, et il n'existe pas de position déméthylée particulière aux gènes transcrits (Mathieu et al., 2002). De plus, par l'utilisation de primers choisis pour amplifier seulement des unités 5S faiblement méthylées, ces auteurs ont pu amplifier 10 unités 5S avec de faibles taux de méthylation allant de 12 à 38%. Mais ces unités appartiennent à différents loci 5S, transcrits (chromosome 4 et grand locus du chromosome 5) ou non (loci 2 et 3 du chromosome 3), et ne correspondent pas préférentiellement aux ARNr 5S (une seule sur les dix copies). Dans le même article, l'impact direct de la méthylation de l'ADN sur la transcription d'un gène d'ARNr 5S a été testé *in vitro*. Et la méthylation des sites CG de ce gène (obtenue par l'action d'une méthylase CG-spécifique) n'entraîne pas d'inhibition de sa transcription en extraits nucléaires de cellules de tabac. De plus, la déméthylation de l'ADNr 5S obtenue en cultivant des plantes sur un milieu contenant différentes concentrations de 5-azacytidine n'induit pas d'augmentation du taux global d'ARNr 5S. Ces différents résultats suggèrent que la méthylation de l'ADNr 5S ne détermine pas à elle seule, l'expression ou la répression des gènes d'ARNr 5S.

Chapitre II

Epigénétique, méthylation de l'ADN et ARN interférence

Le terme épigénétique définit les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes et ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques. Ce type de régulation peut cibler l'ADN ou l'ARN et agir au niveau du noyau ou du cytoplasme. La transmission d'un état épigénétique peut être réalisée par la méthylation de l'ADN, par des modifications post-traductionnelles des histones, et par la déposition de variants d'histones. De plus, il devient de plus en plus évident que les mécanismes médiés par les petits ARN siRNA (small interfering RNA) jouent un rôle central dans la mise en place et le maintien de l'état d'activité des gènes.

1. Différentes méthylations de l'ADN

Différentes bases de l'ADN peuvent être méthylées chez la quasi-totalité des organismes. La modification la plus fréquente est la méthylation de la cytosine au niveau du carbone en position 5 de son cycle. Cette base est nommée 5mC pour 5-méthylcytosine. Cependant, la méthylation d'adénines a été détectée chez des cellules procaryotes, la méthylation d'adénines et d'uraciles a été trouvée chez des eucaryotes unicellulaires (Rae and Steele, 1978; Zhu and Henney, 1990), et des adénines et des guanines méthylées ont été mises en évidence dans des cellules humaines et des cellules d'insectes (Achwal et al., 1983). Les bases 5mC étant les bases modifiées les plus fréquemment trouvées dans les génomes eucaryotes et les plus étudiées, les autres bases modifiées ne seront pas traitées dans la suite de ce manuscrit.

2. La méthylation des cytosines chez les eucaryotes

La méthylation de l'ADN et/ou les enzymes méthylant l'ADN (les ADN méthyltransférases) sont retrouvées chez la plupart des eucaryotes, mis à part des organismes comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* et *C. elegans*. D'autre part, la drosophile contient une faible proportion de 5mC (Gowher et al., 2000 ; Lyko et al., 2000; Salzberg et al., 2004). Un gène, dDNMT2 (drosophila DNA-METHYLTRANSFERASE2), codant une enzyme ressemblant à une ADN méthyltransférase a été rapporté (Hung et al., 1999; Tweedie et al., 1999) et la réduction ainsi que la surexpression de cette protéine influencent le taux de méthylation ADN de drosophile (Kunert et al., 2003). Les génomes de vertébrés sont méthylés à hauteur de 3 à 8% alors que chez les plantes, 20 à 30% des cytosines sont méthylées en moyenne. Le taux de méthylation de l'ADN chez les plantes est très variable entre les espèces : 6% chez *Arabidopsis thaliana* contre 35% chez le tournesol (Wagner and Capesius, 1981).

La méthylation des cytosines est impliquée dans un mécanisme de « silencing » eucaryotique qui protège le génome grâce à l'inactivation d'éléments ADN potentiellement dangereux (dont les transposons) pour le génome (Martienssen and Colot, 2001; Yoder et al., 1997b). La démonstration la plus claire de ceci vient de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, chez qui des transposons sont mobilisés lorsque la méthylation ADN est réduite (Miura et al., 2001; Singer et al., 2001). La méthylation de l'ADN permet aussi de réguler des gènes endogènes chez les plantes et les animaux (Bird, 2002). Par exemple, les plantes utilisent la méthylation de l'ADN pour des phénomènes d'« imprinting » et pour moduler l'expression de familles de gènes répétés (Bender and Fink, 1995; Kinoshita et al., 2004; Lawrence et al., 2004). Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN contrôle également l'« imprinting » mais aussi l'inactivation du chromosome X et le « silencing » des gènes suppresseurs de tumeurs (Bird, 2002).

3. Les ADN méthyltransférases

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est surtout restreinte aux séquences symétriques CG, bien que d'autres contextes soient méthylés dans des cellules souches embryonnaires de souris (Bird, 2002; Ramsahoye et al., 2000). Différemment, cette méthylation chez les plantes intervient dans des contextes symétriques CG et CNG (N : T, G, C ou A) et dans des contextes asymétriques CHH (H : A, T, ou C).

3.1 MET1/DNMT1

Chez les eucaryotes, la première ADN méthyltransférase clonée fut DNMT1 (DNA-METHYLTRANSFERASE1) (Bestor et al., 1988). Celle-ci permet surtout la méthylation de maintenance des sites CG hémiméthylés (Yoder et al., 1997a) et est ciblée au niveau des fourches de réplication dans les noyaux en phase S (Leonhardt et al., 1992) mais DNMT1 possède également une faible activité *de novo* (Yoder et al., 1997a).

Chez les plantes, le gène codant l'ADN méthyltransférase MET1 (METHYLTRANSFERASE1) a été cloné chez *Arabidopsis* par Finnegan et Dennis (Finnegan and Dennis, 1993) grâce aux homologues de séquences existant entre *DNMT1* et *MET1*. Des homologues de MET1 ont été identifiés chez la carotte, le pois, la tomate, le maïs et le riz (Bernacchia et al., 1998 ; Finnegan and Kovac, 2000; Pradhan et al., 1998; Teerawanichpan et al., 2004).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'impact de MET1 sur la méthylation du génome a par la suite été étudié par une stratégie utilisant une séquence ADN antisens pour éteindre

l'expression de ce gène (Ronemus et al., 1996). Ces auteurs ont ainsi observé une diminution du taux global de la méthylation ADN allant jusqu'à plus de 70% dans plusieurs lignées *met1*. De plus, par l'utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation, ils ont pu montrer que l'inhibition de l'expression de MET1 entraîne une baisse de la méthylation au niveau de l'ADNr 5S et des répétitions centromériques 180 pb, aussi bien aux sites CG qu'aux sites CNG (tableau 2). Une autre étude utilisant la même stratégie de génétique inverse, a montré une diminution allant jusqu'à 90% de la méthylation globale CG ainsi qu'une déméthylation aux sites CG et CNG des répétitions centromériques 180 pb (Finnegan et al., 1996). Dans plusieurs plantes descendantes ayant ségrégué la construction antisens MET1, le niveau de méthylation CG reste inférieur à celui de plantes sauvages suggérant que les niveaux de méthylation de l'ADN ne sont pas restaurés après le passage de la méiose. Des croisements répétés de mutants *met1* avec des plantes sauvages restaurent graduellement les niveaux de méthylation ADN ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une perte progressive de l'ADN hypométhylé plutôt qu'une méthylation *de novo* (Vongs et al., 1993). Ces différentes données indiquent que les plantes ne possèdent pas de mécanismes qui restaurent les niveaux normaux de méthylation ADN après la méiose, suggérant que les plantes ne subissent pas de cycle de déméthylation globale suivie par une reméthylation, comme observé dans les stades précoces du développement embryonnaire chez les mammifères (Razin et al., 1984).

MET1 maintient la méthylation de l'ADN dans les contextes symétriques CG et également CNG. Kishimoto et al., ainsi que Bartee et Bender, ont montré que cette enzyme affecte également la méthylation de l'ADN dans les contextes asymétriques CHH, sans conclure si cet effet est direct ou indirect (Bartee and Bender, 2001; Kishimoto et al., 2001).

3.1.1 MET1 : méthylase de maintenance et/ou de novo

DNMT1 ayant surtout une activité méthyltransférase de maintenance, les similarités de séquence entre MET1 et DNMT1 suggèrent que MET1 possède le même type d'activité. Chez *Nicotiana benthamiana* et chez *Arabidopsis thaliana*, le rôle de MET1 dans la maintenance de la méthylation des sites CG a été démontré (Aufsatz et al., 2002a; Jones et al., 2001). De plus, Aufsatz et al. ont confirmé le rôle de maintenance de MET1 et ont suggéré que MET1 est également requise pour l'établissement complet de la méthylation *de novo* dans les contextes CG (Aufsatz et al., 2004). Il reste difficile de trancher au niveau de son activité méthyltransférase *de novo*, étant donné que cette enzyme est nécessaire au maintien de cette méthylation, et que ces deux activités ne peuvent être bien distinguées.

ADN méthyltransférases	Activité
MET1	<ul style="list-style-type: none"> - maintenance CG et CNG - <i>de novo</i> CG
CMT3	<ul style="list-style-type: none"> - maintenance CNG - maintenance C asymétriques cible spécifique - <i>de novo</i> CNG
DRM2 (DRM1)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>de novo</i> CG, CNG et C asymétriques

Tableau 2: Principales ADN méthyltransférases chez *Arabidopsis*.

3.2 CMT3

Un deuxième type d'ADN méthyltransférase est représenté par la classe des chromométhylases qui, comme MET1, sont apparentées à DNMT1 de mammifères, et qui ont la particularité de posséder un chromodomaine inséré entre deux motifs méthyltransférases (Henikoff and Comai, 1998). Les chromodomaines permettent aux protéines qui les possèdent, de cibler l'hétérochromatine (Platero et al., 1995). Cette classe d'ADN méthyltransférases n'existe que chez les plantes, et trois gènes *CMT* (*chromométhylases*) existent chez *Arabidopsis thaliana* (Finnegan and Kovac, 2000). Le gène *CMT1* est prédit comme non fonctionnel car dans tous les écotypes étudiés, la séquence codante de ce gène est interrompue (Henikoff and Comai, 1998). Les gènes *CMT2* et *CMT3* sont transcrits (Genger et al., 1999 ; McCallum et al., 2000), et la fonctionnalité de la protéine CMT3 a été démontrée ((Bartee et al., 2001; Lindroth et al., 2001) ; tableau 2).

Différents allèles mutants de *CMT3* ont été isolés dans un crible supprimeur d'inactivation du gène *SUP* (impliqué dans le développement floral) (Lindroth et al., 2001). En effet, le gène *SUP* (*SUPERMAN*) devient hyperméthylé et inactivé dans différents fonds génétiques qui présentent une hypométhylation globale de leur génome (Jacobsen and Meyerowitz, 1997; Jacobsen et al., 2000). Les allèles *sup* « silencés » sont alors appelés *clark kent* (*clk*). Cette hyperméthylation de *SUP* ressemble à un phénomène observé dans des cellules cancéreuses où la perte globale de la méthylation ADN est associée à l'hyperméthylation et au « silencing » de gènes suppresseurs de tumeurs (Baylin and Herman, 2000). Les allèles *clark kent* sont hyperméthylés en contextes symétriques (CG et CNG) et asymétriques (CHH). Afin d'identifier les loci importants pour le maintien de la méthylation et de l'inactivation de *SUP*, Lindroth et al. ont procédé à une mutagenèse afin de cribler des suppresseurs d'un allèle *clark kent* stable (appelé *clk-st*) (Lindroth et al., 2001) créé par l'introduction d'un locus additionnel de *SUP* dans des plantes *clk* (Jacobsen and Meyerowitz, 1997). Ces auteurs ont alors identifié différents allèles mutants de *CMT3* et ont regardé l'impact de cette mutation sur différentes cibles, par séquençage d'ADN traité au bisulfite. Ainsi un mutant *cmt3* perd la quasi-totalité de la méthylation CNG au niveau de *SUP*, du LTR («long terminal repeat») d'un rétrotransposon Athila péricecentromérique, et des séquences répétées centromériques 180 pb (Lindroth et al., 2001). En revanche, cette mutation *cmt3* ne modifie pas la plupart de la méthylation CG et a des effets variables sur la méthylation asymétrique de ces cibles allant jusqu'à une perte complète de la méthylation asymétrique à l'extrémité 5' du locus *SUP*. De plus pour déterminer si la perte de la méthylation ADN CNG s'applique à une plus grande partie du génome, cette équipe a

procédé à des southern blots avec des enzymes de restriction sensibles à la méthylation. Différents allèles mutants *cmt3* ont une perte de la méthylation CNG au niveau des LTR des séquences Athila (précédemment ils analysaient un seul LTR d'une séquence Athila par la méthode de séquençage au bisulfite), des séquences centromériques 180 pb, et du transposon Ta3, alors que leur méthylation CG ne varie pas (Lindroth et al., 2001).

Dans un deuxième crible, cette fois supprimeur de « silencing » de *PAI* (« *phosphoribosylanthranilate isomerase* »), d'autres allèles mutants *cmt3* ont été isolés chez *Arabidopsis thaliana* (Bartee et al., 2001). Le gène *PAI2* code une enzyme intermédiaire dans la voie de biosynthèse du tryptophane et la perte de l'expression de *PAI* entraîne des phénotypes pléiotropiques dont l'accumulation d'intermédiaires du tryptophane fluorescents. Dans l'écotype WS d'*Arabidopsis thaliana*, une répétition inversée *PAI1-PAI4* entraîne sa propre méthylation et celle de *PAI2* (Bender and Fink, 1995). Un crible supprimeur de ce « silencing » a identifié des mutations de *CMT3*, la suppression de cette inactivation étant due à une perte de la méthylation non-CG (c'est-à-dire CNG et asymétrique) (Bartee et al., 2001). Ces auteurs ont aussi observé une réduction de la méthylation des séquences répétées centromériques 180 pb. Récemment, des expériences de microarray ont montré que *CMT3* cible préférentiellement les éléments transposables de tout type, dans le génome (Tran et al., 2005).

D'autre part, une méthylase de la classe des CMT a été caractérisée chez le maïs grâce à une approche de génétique inverse ; cette chromométhylase *ZMET2* est requise pour la méthylation des sites CNG de l'ADNr, de l'ADNr 5S et des séquences centromériques, alors que la mutation de *zmet2* n'affecte pas la méthylation CG (Papa et al., 2001). De plus, aucune réduction des méthylations CG et asymétrique n'a été observée au niveau des répétitions 180 pb du knob (Papa et al., 2001).

Ces trois études indiquent que les gènes *CMT* codent les méthyltransférases CNG majeures des plantes, et l'absence d'homologues CMT chez les mammifères peut expliquer que, contrairement aux plantes, les animaux maintiennent surtout la méthylation CG.

3.3 « Domains Rearranged Methyltransferases »

Les gènes *DRM1* (« *Domains Rearranged Methyltransferases* ») et *DRM2* d'*Arabidopsis* et *ZMET3* de maïs ont été décrits comme ayant un fort taux de conservation de séquences avec *DNMT3* de mammifères, suggérant que ces gènes codent des méthyltransférases ADN à activité *de novo* (Cao et al., 2000). Le terme « Domains Rearranged Methyltransferases » a été choisi car ces protéines de plantes possèdent un nouvel arrangement des motifs

catalytiques conservés par rapport aux autres méthyltransférases eucaryotiques connues. En 2002, l'activité *de novo* de DRM1 et DRM2 a été démontrée grâce à des mutants perte de fonction de ces gènes (Cao and Jacobsen, 2002b). Ainsi chez un double mutant *drm1 drm2*, la méthylation CG préexistante est retenue au niveau du locus endogène *FWA* alors que la méthylation CG *de novo* associée au « silencing » d'un transgène *FWA*, est bloquée (Cao and Jacobsen, 2002b). D'autre part, cette double mutation bloque également les méthylations CNG et asymétrique *de novo* ainsi que l'inactivation du gène *SUP* endogène, qui sont normalement provoquées par une répétition de *SUP* inversée ((Cao and Jacobsen, 2002b) ; tableau 2). Cependant, aucune réactivation d'allèles *clk* préalablement inactivés n'a été observée dans le double mutant *drm1 drm2*, et la majorité de la méthylation préexistante au niveau de *SUP* est retenue dans le double mutant. De même, ces auteurs n'ont pas détecté de perte de méthylation CG ni CNG au niveau des séquences centromériques 180 pb, ceci suggérant que les mutations *drm* n'affectent pas la maintenance de la méthylation de ces répétitions. Ces différents résultats suggèrent que les gènes *DRM* codent les enzymes majeures de méthylation *de novo* ciblant *FWA* et *SUP* (Cao and Jacobsen, 2002b). Cependant, dans la même étude, Cao et al. ont aussi testé les simples mutants *drm1* et *drm2* par transformation avec un transgène *FWA* et ont ainsi montré que la mutation *drm2* seule, mais pas la mutation *drm1*, bloque la méthylation *de novo* et le « silencing » normalement associé à ce transgène. Ceci est en accord avec des observations précédentes montrant un taux global d'ARN DRM2 beaucoup plus important que celui de DRM1 (Cao et al., 2000). Ces résultats suggèrent que DRM2 est l'ADN méthyltransférase *de novo* prédominante chez *Arabidopsis thaliana*. D'autre part, le fait que les mutants *drm* bloquent la méthylation ADN *de novo* de *FWA* et de *SUP* mais ne causent pas une perte importante de la méthylation préexistante de ces gènes après croisements, indiquent que *FWA*, *SUP* ainsi que les séquences centromériques 180 pb ne subissent pas en temps normal de perte de leur méthylation d'une génération à l'autre (Cao and Jacobsen, 2002b). Cette interprétation est en accord avec des résultats montrant une absence de reméthylation après ségrégation d'une mutation déméthylante (Kakutani et al., 1999). Ceci supporte la notion, déjà évoquée au paragraphe 3.1 de ce chapitre, d'absence de déméthylation suivie par une méthylation *de novo* du génome des plantes durant leur développement, contrairement aux mammifères (Reik et al., 2001).

D'autres résultats provenant du même groupe suggèrent que les méthyltransférases DRM possèdent également une activité de méthylation de maintenance au niveau des sites

CNG et asymétriques, et agissent de manière redondante avec CMT3 (voir paragraphe 3.2 de ce chapitre) au niveau de certains loci (Cao and Jacobsen, 2002a).

Chez *Nicotiana tabacum*, un cDNA codant une protéine ressemblant aux DRM d'*Arabidopsis* et de maïs a été isolé, et l'activité méthyltransférase de la protéine correspondante testée *in vitro* cible préférentiellement les sites CNG et asymétriques (Wada et al., 2003).

4. DDM1

Une mutagenèse EMS visant à isoler des mutants d'*Arabidopsis* présentant une réduction de leur méthylation ADN, a permis d'isoler différentes mutations à deux loci, *DDM1* (« *Decrease in DNA Methylation 1* ») et *MET1* (nommé alors *DDM2*) (Vongs et al., 1993). Dans les plantes mutantes *ddm1*, la méthylation ADN est réduite globalement de 70%, cette hypométhylation touchant aussi bien les sites CG que les sites CNG (Vongs et al., 1993). *DDM1* code un facteur de remodelage de la chromatine apparenté aux protéines SWI2/SNF2 et des études *in vitro* ont montré qu'elle possède une activité ATPase et la capacité à repositionner les nucléosomes (Brzeski and Jerzmanowski, 2003; Jeddeloh et al., 1999). Ainsi, l'effet observé de DDM1 sur la méthylation ADN est indirect et son action de remodelage de la chromatine permettrait un accès facilité de l'ADN aux ADN méthyltransférases (Jeddeloh et al., 1999). La mutation *ddm1* est récessive, et au cours de croisements successifs entre des plantes homozygotes mutantes *ddm1*, une diminution graduelle de la méthylation ADN est observée. Dans les premières générations homozygotes *ddm1/ddm1*, les séquences répétées, comme les répétitions centromériques et péri-centromériques associées à l'hétérochromatine, sont hypométhylées, et après plusieurs générations d'autofécondation, la méthylation de séquences simples copies est également réduite (Kakutani et al., 1996; Vongs et al., 1993). L'effet progressif de cette mutation sur des séquences peu ou non répétées suggère une implication de DDM1 dans la méthylation ADN de maintenance. Le mécanisme d'action de DDM1 n'est pas connu, mais l'homologue de DDM1 chez la souris, la protéine LSH (« *Lymphoid Specific Helicase* »), contrôle aussi la méthylation ADN (Dennis et al., 2001). Ceci indique une fonction conservée de DDM1, à la différence près que les souris mutantes *lsh* meurent peu de temps après leur naissance (Dennis et al., 2001; Geiman et al., 2001), alors que les plantes mutantes *ddm1* sont viables et fertiles.

D'autre part, dans des mutants homozygotes *ddm1*, la méthylation *de novo* de l'ADN peut avoir lieu ; en effet, de façon surprenante, le gène *SUP* devient hyperméthylé au niveau

de cytosines symétriques et asymétriques dans différentes lignées homozygotes *ddml* (Jacobsen et al., 2000). Ceci est en opposition avec le fait que l'hyperméthylation de transgènes et des gènes endogènes *PAI* n'est pas maintenue dans un fond génétique *ddml* mutant (Jeddeloh et al., 1998; Mittelsten Scheid et al., 1998).

5. Déméthylation de l'ADN : DEMETER et ROS1

Chez les vertébrés, la déméthylation de l'ADN peut se produire de manière passive lorsque plusieurs cycles de réplication de l'ADN ont lieu sans maintenance de la méthylation, ou bien de façon active en absence de réplication (Kress et al., 2001). Au niveau des embryons de mammifères, avant l'implantation, le génome maternel est déméthylé par un processus passif au cours des divisions cellulaires, alors que le génome paternel est déméthylé activement immédiatement après la fécondation (Reik et al., 2001). A cette déméthylation globale, s'ajoute une déméthylation spécifique à certains sites durant le développement et la différenciation des tissus (Frank et al., 1991). Contrairement aux études génétiques, biochimiques et biologiques des ADN méthyltransférases, la déméthylation active est mal comprise d'un point de vue enzymatique. Un des mécanismes proposés pour expliquer la déméthylation est la rupture de la liaison N-glycosidique liant la base 5-méthylcytosine (5mC) avec le déoxyribose correspondant, suivie par le remplacement avec une cytosine non modifiée. Une activité glycosylase ciblant les 5mC (5mC ADN glycosylase) a été identifiée pour la première fois dans des embryons de poulet (Jost et al., 1995) et celle-ci a été copurifiée avec une protéine homologue à la thymine ADN glycosylase humaine (TDG pour Thymine DNA Glycosylase) (Neddermann et al., 1996; Zhu et al., 2000b). Par la suite, il a été rapporté que MBD4 (« methyl-CpG Binding Protein 4 »), une ADN glycosylase humaine sans similitudes de séquences avec TDG, avait également une activité 5mC ADN glycosylase (Zhu et al., 2000a). TDG et MBD4 sont des ADN glycosylases présentant une préférence pour les mésappariements U-G et T-G dans un contexte CG (Hendrich et al., 1999; Sibghat et al., 1996). Cependant, ces protéines n'ont qu'une faible activité sur les 5mC-G comparée à celle dirigée contre les mésappariements U-G et T-G (Hardeland et al., 2003; Hendrich et al., 1999; Zhu et al., 2000a). Le rôle de ces protéines dans la déméthylation active de l'ADN reste donc assez flou. Il a été aussi suggéré que la déméthylation de l'ADN pourrait avoir lieu indirectement par la déamination des 5mC par des cytidines déaminases, suivie par la réparation des mésappariements T-G ainsi générés (Morgan et al., 2004).

Chez les plantes, des travaux récents ont démontré l'implication d'ADN glycosylases dans la déméthylation active de l'ADN. DEMETER (DME) a été identifiée lors d'un crible visant à isoler des mutations entraînant des effets d'origine parentale sur la viabilité des graines (Choi et al., 2002). DME est nécessaire à l'expression de l'allèle maternel *MEDEA* (*MEA*) ; le gène *DME* code une grande protéine possédant un domaine ADN glycosylase et un signal de localisation nucléaire (Choi et al., 2002). La plupart des ADN glycosylases fonctionnent dans la voie de réparation de l'ADN par excision de base (ou BER pour « Base Excision DNA Repair »), qui induit l'excision de bases « abimées », modifiées, ou mal appariées, puis la coupure de l'ADN et le remplacement des sites abasiques créés, par des bases « normales ». L'expression ectopique de DME dans les feuilles induit des cassures simple-brin dans le promoteur de *MEA*, ce qui est en accord avec sa fonction ADN glycosylase et une action directe de DME sur *MEA* (Choi et al., 2002). De manière intéressante, Xiao et al. ont isolé quatre mutants qui empêchent l'avortement des graines dû à la mutation *dme* (Xiao et al., 2003). Toutes ces mutations se sont révélées toucher le gène *MET1*. La transmission d'un allèle *met1* maternel mutant par le gaméophyte femelle s'est révélée suffisante pour complètement supprimer l'avortement des graines dû à la mutation *dme*, alors que la transmission d'un allèle *met1* paternel mutant a peu, voir pas d'effet sur cet avortement (Xiao et al., 2003). Les résultats de cet article ont montré que la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le contrôle de l'empreinte de *MEA* et la viabilité des graines, et que ces processus sont contrôlés par l'antagonisme entre MET1 et DME dans le gaméophyte femelle (figure 10). En 2004, Kinoshita et al. ont montré que l'allèle maternel *FWA* est exprimé dans la cellule centrale et dans l'endosperme contrairement à l'allèle paternel qui est « silencé », et que l'activation de l'allèle maternel est également dépendant de DME (Kinoshita et al., 2004).

Chez *Arabidopsis*, une deuxième ADN glycosylase, ROS1 (« Repressor Of Silencing 1 »), a été identifiée dans un crible visant à isoler des mutants ayant une expression dérégulée du transgène RD29A-LUC (Gong et al., 2002). La mutation de *ROS1* entraîne le « silencing » de ce transgène et du gène endogène *RD29A* ; le promoteur de ces séquences est alors hyperméthylé (Gong et al., 2002). Cette inactivation peut être relevée par la mutation *ddm1* ou par l'utilisation de l'inhibiteur de la méthylation des cytosines, la 5-aza-C (Gong et al., 2002). Ces auteurs ont montré que le gène *ROS1* code une protéine possédant une activité bifonctionnelle ADN glycosylase/lyase dirigée contre de l'ADN méthylé *in vitro* (figure 11).

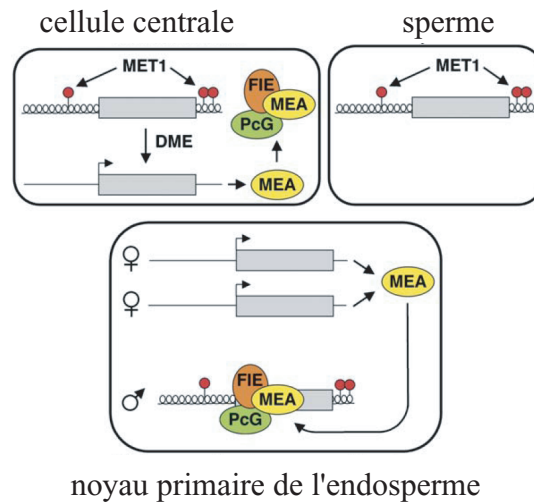


Figure 10: Modèle de régulation de l'imprinting de *MEDEA*. La méthylation de *MEDEA* est maintenue par MET1. Dans la cellule centrale, DEMETER retire la méthylation de *MEA* qui est alors exprimé. Dans l'endosperme, des protéines polycomb dont MEA, exprimées par le génome maternel, silencent l'allèle *MEA* paternel. (Gehring et al. , 2006).

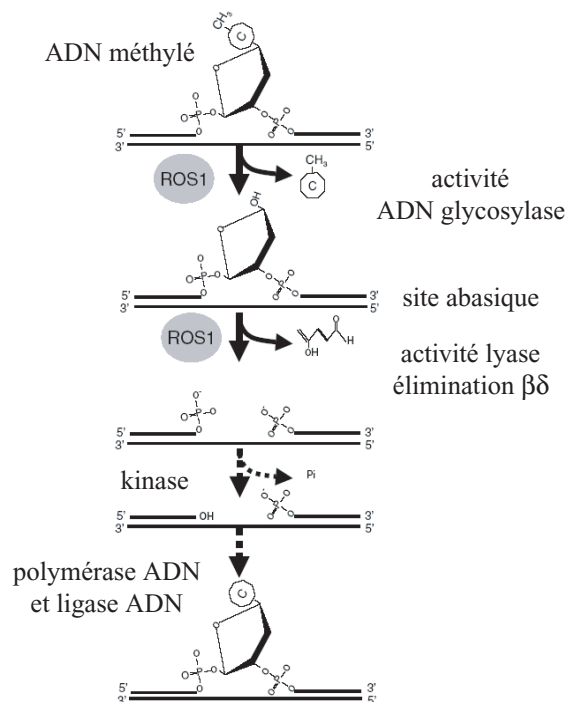


Figure 11: Modèle des activités biochimiques de ROS1 de Kapoor et al. (2005).

L'activité glycosylase de ROS1 retire la cytosine méthylée puis son activité lyase coupe l'ADN par un mécanisme d'élimination βδ. L'ADN est par la suite réparé par un mécanisme inconnu impliquant certainement une kinase, une polymérase ADN et une ligase.

Les effets de ROS1 et de DME contrecarrant la méthylation de l'ADN et l'inactivation de gènes peuvent être expliqués de deux manières. La première possibilité est que ces deux protéines exercent des effets indirects grâce à des interactions avec des facteurs de transcription et/ou des protéines de modification de la chromatine. La deuxième possibilité est que ROS1 aussi bien que DME excisent directement les 5mC de l'ADN, initiant le remplacement par des cytosines non méthylées et permettant l'hypométhylation et l'activation de gènes. Morales-Ruiz et al. ont confirmé la deuxième hypothèse (Morales-Ruiz et al., 2006). Ces auteurs ont montré que DME et ROS1 catalysent le clivage des 5mC de l'ADN par un mécanisme glycosylase/lyase. Ces deux protéines agissent sur les 5mC en contexte CG mais également en contexte CNG (plus précisément CAG) et asymétriques (Morales-Ruiz et al., 2006).

6. Phénomènes de TGS

L'inactivation de gènes peut avoir lieu à travers une répression transcriptionnelle appelée TGS (« Transcriptional Gene Silencing »), ou par une dégradation de l'ARNm, dénommée PTGS (« Post-Transcriptional Gene Silencing »). Ces deux voies ne sont pas cloisonnées, et chez les plantes, le TGS et le PTGS peuvent faire intervenir des intermédiaires communs, comme par exemple, des ARN double-brin.

Lors de transformations de plantes par des transgènes, il a été remarqué qu'il existe souvent une relation inverse entre le nombre de copies du transgène et le niveau d'expression de celui-ci. Ainsi plusieurs études ont montré que des transgènes multicopies subissent du TGS accompagné par l'hyperméthylation de ces transgènes sans que ces études aient pu déterminer si cette hyperméthylation est une cause ou une conséquence du TGS (Assaad et al., 1993; Furner et al., 1998; Mittelsten Scheid et al., 1998). Il faut remarquer que des transgènes présents à une copie peuvent également subir un phénomène de TGS comme chez le pétunia (Elomaa et al., 1995; Meyer et al., 1993). Ces exemples de TGS impliquent un ou plusieurs transgènes insérés au même locus, et se produisent en *cis*. Cependant des transgènes qui sont initialement actifs peuvent être « silencés » en *trans* par l'introduction d'un autre transgène par transformation ou par croisement (Fagard and Vaucheret, 2000). Il a été montré qu'un ARN double-brin contenant des séquences promotrices peut induire le TGS et la méthylation *de novo* d'un transgène contenant ces séquences promotrices (ou d'un gène endogène) (Mette et al., 2000). Ceci a permis de conclure qu'un ARN double-brin peut permettre un phénomène de TGS en *trans*.

6.1 Les mutants et les cibles du TGS

6.1.1 Transgènes

Afin d'isoler les gènes impliqués dans les phénomènes de TGS, des cribles génétiques ont été effectués visant à identifier des suppresseurs de TGS de lignées transgéniques d'*Arabidopsis*. Par exemple, une lignée A contenant plusieurs copies du gène codant l'hygromycine transférase dirigé par un promoteur 35S à un locus, a été utilisée ; le locus A est inactivé et hyperméthylé (Mittelsten Scheid et al., 1998). Huit mutants *som* (« *suppression of methylation* ») ont ainsi été isolés dans lesquels le locus A est réactivé et hypométhylé. L'ADNr et les répétitions centromériques sont hypométhylés dans les mutants *som*, comme observé précédemment dans les mutants *ddm1* et *met1* (Richards, 1997). En réalité, *som1*, *som4*, *som5*, *som7* et *som8* sont des allèles mutants de *DDM1*. MET1 est aussi impliquée dans le phénomène de TGS puisque la mutation *met1* peut lever le « silencing » d'un transgène 35S-GUS (Morel et al., 2000). Dans un deuxième crible suppresseur de TGS, une lignée portant au locus C trois transgènes a été utilisée (Furner et al., 1998). Ce crible a permis d'identifier deux autres loci appelés *HOG1* (« *HOmology-dependent Gene silencing* ») et *SIL1*. Dans le mutant *hog1*, les trois transgènes sont hypométhylés et réactivés, alors que le mutant *sil1* réactive deux des transgènes sans affecter leur méthylation.

6.1.2 Séquences endogènes

Dans des plantes mutantes *ddm1* homozygotes, les séquences répétées centromériques et péricentromériques, ainsi que des transposons sont préférentiellement déméthylés. Ainsi les séquences TSI (« *Transcriptionally Silent Information* ») qui sont péricentromériques et normalement « silencées » sont réactivées par différents allèles mutants de *ddm1* et de *met1* (Steimer et al., 2000). Récemment, de manière surprenante, May et al. ont montré une activation de la transcription des répétitions centromériques 180 pb dans les mutants *ddm1* et *met1* (May et al., 2005). Plusieurs transposons peuvent également devenir transcriptionnellement actifs dans le contexte mutant *ddm1* (Lippman et al., 2003), cette réactivation pouvant aller jusqu'à la capacité à transposer pour certains éléments (Hirochika et al., 2000; Miura et al., 2001; Singer et al., 2001). Un autre exemple de déméthylation d'un transposon permettant sa transposition est donné par CACTA, qui est réactivé dans les simples mutants *met1* et *cmt3* mais qui transpose uniquement dans le double mutant *met1cmt3* (Kato et al., 2003). Parmi les gènes endogènes réactivés dans les mutants de TGS,

on trouve le gène *PAI2* (évoqué dans le paragraphe 3.2) et le gène *FWA* (voir paragraphe 6). En effet, ces gènes sont hypométhylés et réactivés dans les mutants *ddm1* et *met1* (Bartee and Bender, 2001 ; Jeddeloh et al., 1998; Kinoshita et al., 2004; Soppe et al., 2000).

Nous avons déjà évoqué dans le paragraphe 3.2, que plusieurs allèles mutants de *cmt3* ont été isolés dans un crible suppresseur d'inactivation du gène *SUP* (Lindroth et al., 2001) et d'autres allèles mutants de cette chromométhylase ont été identifiés dans un deuxième crible suppresseur de l'inactivation du gène *PAI2* (Bartee et al., 2001). CMT3 participe donc au TGS de ces gènes. De plus, une étude couvrant le génome a montré que la mutation de *cmt3* induit une perte de méthylation préférentiellement au niveau des transposons (Tompá et al., 2002). D'autre part, la mutation des gènes *DRM* (voir paragraphe 3.3) prévient l'établissement de l'inactivation des gènes *FWA* et *SUP* (Cao and Jacobsen, 2002b).

Par ailleurs, des défauts de maintenance de la méthylation de l'ADN et du TGS peuvent être une conséquence de mutations des gènes codant les enzymes requises pour la réaction de méthylation elle-même, comme HOG1, isolé par Furner en 1998 (Furner et al., 1998). En effet, dans des plantes mutantes *hog1*, l'ADNr est hypométhylé. HOG1 code une S-Adénosyl-L-Homocystéine (SAH) hydrolase qui dégrade SAH (Rocha et al., 2005). SAH est un inhibiteur compétitif des réactions dépendantes de SAM (S-Adénosyl Méthionine), dont les activités ADN méthyltransférases. D'autre part, *sill* (vu dans la section 6.1.1 de ce chapitre) a été identifié comme un allèle mutant d'une histone déacétylase dont la mutation induit l'hypométhylation de l'ADNr (Probst et al., 2004).

6.1.3 Les gènes inactivés dans des mutants de TGS

Deux gènes endogènes définissent un deuxième groupe de séquences dérégulées dans des mutants de TGS. Les gènes impliqués dans le développement floral *SUP* et *AG* (*AGAMOUS*) peuvent être hyperméthylés et inactivés dans les mutants *met1* et *ddm1*, alors que le reste du génome est globalement hypométhylé (Jacobsen et al., 2000). L'hyperméthylation de ces gènes suggère une redistribution de la méthylation ADN dans ces contextes globalement déméthylés. Ceci pourrait être dû à des changements de la chromatine rendant *SUP* et *AG* accessibles à la machinerie de méthylation.

6.2 Suppression du TGS et maintien de la méthylation ADN

6.2.1 La protéine MOM1

Une mutagenèse de la lignée A (décrite au paragraphe 6.1.1) contenant le locus transgénique HPT hyperméthylé et « silencé », a permis d'isoler le gène *MOM1* (pour « MORPHEUS' Molecule ») (Amedeo et al., 2000). Le gène *MOM1* code une protéine possédant une région apparentée aux protéines SWI2/SNF2. On peut donc supposer que tout comme DDM1, MOM1 participe au TGS probablement via le remodelage de la chromatine. La mutation de *MOM1* a la particularité de permettre la réactivation du locus HPT dans la lignée A sans altérer sa méthylation ADN ; de même la méthylation ADN des répétitions centromériques 180 pb n'est pas affectée par cette mutation (Amedeo et al., 2000). Deux hypothèses peuvent alors être formulées : soit MOM1 agit en aval de la méthylation ADN dans la régulation épigénétique, soit MOM1 appartient à une voie épigénétique indépendante de la méthylation ADN (Amedeo et al., 2000). En 2000, Steimer et al. ont identifié des cibles endogènes de MOM1 (Steimer et al., 2000). La population des ARNm de la lignée A « silencée » au locus HPT a été comparée aux ARNm du mutant *mom1* possédant un locus A réactivé, par une méthode d'hybridation soustractive (Steimer et al., 2000). Ainsi, ces auteurs ont identifié deux clones ADNc, TSI-A et TSI-B. Les séquences TSI (« Transcriptionally Silent Information ») font partie d'une famille de rétroéléments Athila dégénérés, et sont localisés dans la région péricecentromérique des cinq chromosomes d'*Arabidopsis thaliana* (Steimer et al., 2000). Dans le mutant *mom1*, les séquences TSI sont réactivées sans changement de leur méthylation ADN, comme le locus A (Steimer et al., 2000). Contrairement à des plantes mutantes *met1* ou *ddm1* (Finnegan et al., 1996; Kakutani et al., 1996; Ronemus et al., 1996), les plantes mutantes *mom1* ne présentent pas de défauts phénotypiques, même après neuf générations d'autofécondation. Cette différence entre ces mutants de TGS suggère que la mutation *mom1* affecte un nombre de loci réduit par rapport à ceux touchés dans les mutants de TGS ciblant la méthylation ADN. Une possibilité est que MOM1 inactive des séquences appartenant à des compartiments chromosomiques/subnucléaires particuliers, ou possédant une organisation génomique spécifique (multicopies, ou répétitions inversées par exemple). Par ailleurs, Probst et al. ont montré que MOM1 agit visiblement au niveau de la régulation transcriptionnelle dans un contexte hétérochromatique (Probst et al., 2003). De plus, la mutation *mom1* n'affecte pas la distribution globale de l'acétylation et de la méthylation des histones, contrairement à la mutation *ddm1* (Probst et al., 2003).

Afin de savoir si MOM1 participe à une voie de « silencing » indépendante de la méthylation ou agit en aval de la méthylation ADN, Mittelsten Scheid et al. ont étudié les relations épistatiques entre les mutants *mom1* et *ddm1* par l'obtention de lignées double mutantes *mom1ddm1* (Mittelsten Scheid et al., 2002). Une suppression synergique du « silencing » du locus transgénique HPT et des séquences TSI, des défauts de développement des plantes, et des changements spécifiques de l'architecture nucléaire ont été observés dans les plantes double mutantes *mom1ddm1* (Mittelsten Scheid et al., 2002). Ces données démontrent une relation non épistatique entre DDM1 et MOM1, et suggèrent l'existence de deux mécanismes indépendants d'inactivation transcriptionnelle (TGS), avec DDM1 ou MOM1 comme composants essentiels. De plus, ces auteurs font l'hypothèse que la voie de « silencing » indépendante de la méthylation ADN pourrait renforcer la voie d'inactivation des gènes dépendante de la méthylation, prévenant une dérégulation épigénétique rapide chez les plantes portant des défauts de méthylation.

Il apparaît important de déterminer d'autres cibles de MOM1, ainsi que d'éventuels partenaires de cette protéine afin de mieux comprendre son mode d'action. Mes travaux de thèse ont permis d'identifier d'autres cibles de MOM1 : ces données sont présentées dans la partie résultats de ce manuscrit.

6.2.2 Les protéines BRU1 et CAF-1

Dans une mutagenèse cherchant à isoler des composants impliqués dans la reconnaissance et la réparation de dommages de l'ADN, Takeda et al. ont isolé le gène *BRU1* (Takeda et al., 2004). Les mutants *bru1* sont hypersensibles à différents stress génotoxiques et lèvent le « silencing » de transgènes aussi bien que des séquences endogènes TSI, sans affecter la méthylation ADN des TSI (Takeda et al., 2004). De plus, la mutation des gènes *FAS1* et *FAS2*, qui codent deux sous-unités de CAF-1 qui est un complexe de remodelage de la chromatine (Kaya et al., 2001), entraîne également une hypersensibilité à des stress génotoxiques et la suppression de « silencing » d'un transgène et des séquences TSI sans changement de la méthylation ADN (Takeda et al., 2004). Dans des cellules humaines, CAF-1 facilite l'incorporation des histones H3 et H4 au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé durant la réplication (Smith and Stillman, 1989). Les résultats de Takeda et al. impliquent donc un lien important entre la réplication de la chromatine, la réparation de l'ADN, et le « silencing » (Takeda et al., 2004).

6.2.3 La protéine RPA2

Récemment, deux articles ont montré que RPA2 est impliquée dans le TGS (Elmayan et al., 2005; Kapoor et al., 2005a). RPA2 code une protéine homologue à la deuxième sous-unité de la protéine RPA (« Replication Protein A ») de mammifères et de levures ; RPA2 porte des motifs impliqués dans la réplication et dans la réparation de l'ADN. Elmayan et al. ont procédé à une mutagenèse d'une lignée de plantes portant un transgène inactivé L5 (composé de plusieurs copies des gènes rapporteurs pNOS-NPTII et 35S-GUS), alors que Kapoor et al. ont utilisé une mutagenèse sur des plantes mutantes *ros1* (voir le paragraphe 5) contenant un transgène composé de pRD29A-Luciférase et de 35S-nptII qui est inactivé dans ce contexte mutant. Dans le cas de ces deux études, le gène rapporteur dirigé par le promoteur 35S est réactivé par la mutation *rpa2*. Cette levée de « silencing » s'effectue sans changement de la méthylation ADN de ces gènes rapporteurs (Elmayan et al., 2005; Kapoor et al., 2005a). En revanche, Kapoor et al. ont montré que les méthylations histones H3K4me2 et H3K9me2 du promoteur 35S sont modifiées. De plus, la perte de RPA2 engendre la réactivation d'éléments transposables hétérochromatiques (Kapoor et al., 2005a). La réactivation de ces éléments n'est pas non plus accompagnée par une modification de leur méthylation ADN. Elmayan et al. décrivent quant à eux une faible réactivation des séquences TSI dans le contexte mutant *rpa2* (Elmayan et al., 2005). De plus, les deux articles montrent que par rapport à des plantes sauvages, les plantes mutantes *rpa2* sont plus sensibles aux dommages de l'ADN engendrés par du MMS (pour « Methyl Methane Sulfonate »), tout comme les plantes *ros1*.

Tout comme l'article de Takeda et al. ((Takeda et al., 2004) ; voir paragraphe 6.2.2), les deux études précédentes suggèrent une coordination de la machinerie de TGS avec la réplication et la réparation de l'ADN.

Plus récemment, la recherche de supresseurs de « silencing » dû à la mutation *ros1* a permis d'identifier de nouveau la mutation *rpa2* (Xia et al., 2006). Ces auteurs ont confirmé les résultats publiés par Kapoor et al. (Kapoor et al., 2005a) et ont montré que RPA2 est fortement exprimé dans les méristèmes et que les divisions cellulaires méristématiques sont affectées par la mutation *rpa2*. Les méristèmes étant le lieu de divisions actives, ces résultats confirment le rôle de RPA2 dans la réplication de l'ADN.

7. PTGS et ARN interférence

Des expériences visant à augmenter la coloration de pétunias par la surexpression d'un transgène codant une protéine impliquée dans la synthèse de pigments, ont eu pour résultat

une diminution voire une perte complète de la coloration des fleurs (Napoli et al., 1990). Ceci est dû à un phénomène de suppression éteignant l'activité du transgène et du gène endogène au niveau post-transcriptionnel via des ARN.

Le phénomène le plus connu de « silencing » médié par des ARN a lieu dans le cytoplasme. Il est connu sous les noms de PTGS chez les plantes, ARN interférence chez les mammifères, et quelling chez *Neurospora crassa*. Ce phénomène, conservé au cours de l'évolution, implique un ARN double-brin qui est clivé en petits ARN d'environ 20 nucléotides (nt) appelés siRNA (« short interfering RNA »). Ce clivage a lieu via une enzyme RNase III DICER (Carmell and Hannon, 2004). Ces petits ARN, de 21 à 26 nt, sont ensuite incorporés dans des complexes effecteurs de « silencing », qu'ils guident jusqu'aux cibles d'acides nucléiques complémentaires. En réalité, suivant la nature de la séquence cible et la composition protéique des complexes effecteurs, plusieurs types de « silencing » peuvent être différenciés (Grewal and Rice, 2004; Matzke and Matzke, 2004; Schramke and Allshire, 2004).

7.1 siRNA

Le RNAi (« RNA interference ») est initié par des siRNA générés par DICER, ciblant des ARNm complémentaires pour leur dégradation par un complexe RISC (« RNA-Induced Silencing Complex »). Un des composants essentiels de RISC est une protéine ARGONAUTE, qui peut lier des petits ARN (Yan et al., 2003) et dans certains cas cliver l'ARNm cible ((Liu et al., 2004; Meister et al., 2004) ; figure 12). Une autre protéine importante de la machinerie RNAi est une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP pour « RNA-dependent RNA Polymerase »), qui synthétise des ARN double-brin à partir d'ARN simple-brin pour initier ou amplifier la réaction de RNAi (Martienssen, 2003; Sijen et al., 2001a). De plus, des siRNA peuvent provenir de transposons (Aravin et al., 2003; Hamilton et al., 2002; Lippman et al., 2003; Vastenhouw and Plasterk, 2004; Zilberman et al., 2003) et de virus qui produisent des ARN double-brin durant leur réplication (Xie et al., 2004), aussi bien que de séquences répétées (Aravin et al., 2004; Volpe et al., 2002) ou de gènes (Ambros et al., 2003; Xie et al., 2004) transcrits bidirectionnellement. Les protéines DICER, ARGONAUTE et RdRP sont codées par des familles multigéniques dans plusieurs espèces. Chez la drosophile et chez les mammifères, aucune RdRP n'a été identifiée.

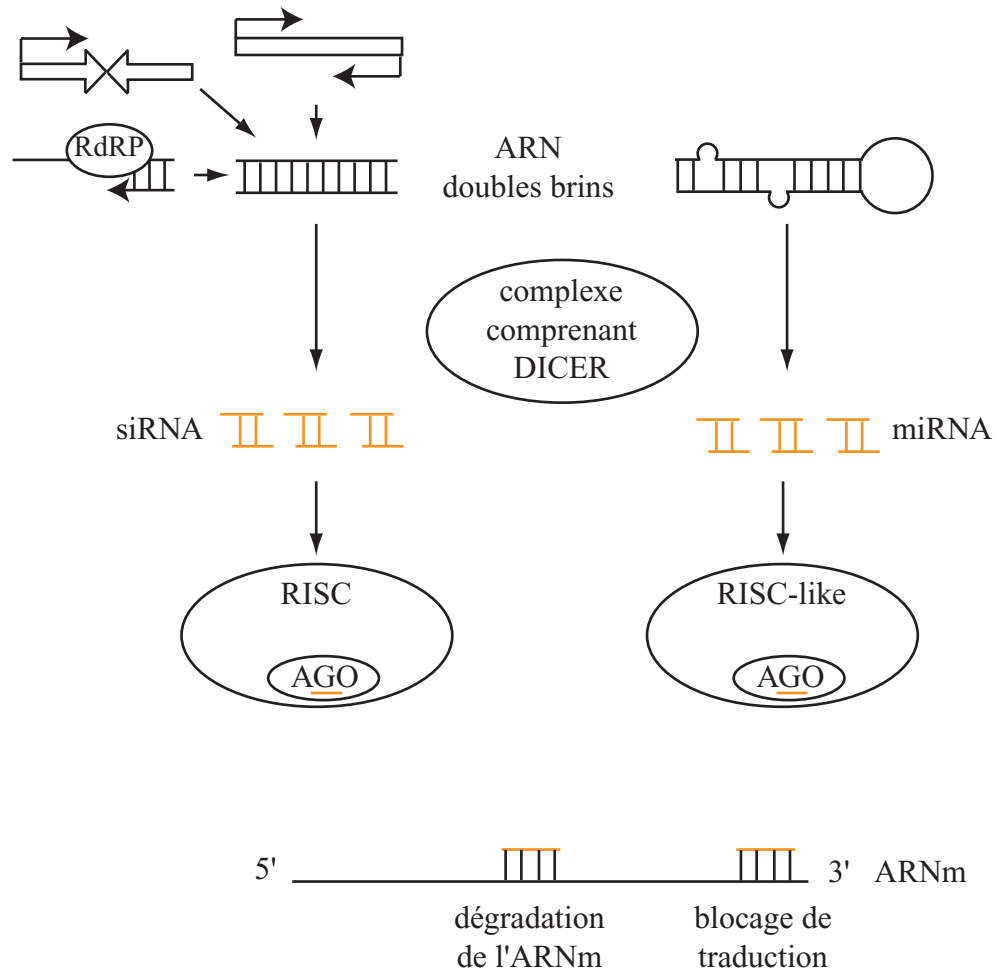


Figure 12: Silencing post-transcriptionnel via les siRNA et les miRNA. L'ARN double brin qui donnera les siRNA peut provenir de l'action d'une RdRP sur un ARN, ou de la transcription bidirectionnelle d'un gène, ou de la transcription de répétitions inversées. D'après Matzke et al. (2004).

7.2 miRNA

Les microRNA (miRNA) appartiennent à une deuxième classe de petits ARN pouvant induire du « silencing » en ciblant des ARNm. Ces miRNA sont produits par le clivage d'ARN en épingles à cheveux imparfaites par DICER. Les miRNA sont incorporés dans des complexes RISC-like et, suivant le degré de complémentarité avec l'ARNm cible, ils induisent une répression traductionnelle ou un clivage de cet ARN (figure 12). Le PTGS dirigé par les miRNA est essentiel dans le développement des plantes et des animaux (Bartel, 2004; He and Hannon, 2004).

La spécificité du PTGS induit par des siRNA et des miRNA, est due à l'appariement de ces petits ARN avec l'ARN cible. Cependant, les petits ARN (et notamment les siRNA) peuvent s'apparier avec de l'ADN, et le processus de RNAi peut ainsi affecter l'expression des gènes. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à cet aspect dans le paragraphe suivant.

8. Petits ARN et « silencing » nucléaire

Les petits ARN peuvent diriger la méthylation de l'ADN dans un processus appelé RdDM (« RNA-directed DNA Methylation ») ainsi que la formation d'hétérochromatine, notamment via la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9). Ces modifications peuvent influencer de manière épigénétique l'expression des gènes affectés. Historiquement, le phénomène de RdDM a été décrit chez les plantes, tandis que la formation d'hétérochromatine via le RNAi a été rapportée chez *S. pombe*. Chez les organismes supérieurs, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones sont interconnectées et se renforcent. Cependant, aucune méthylation ADN n'a été détectée chez *S. pombe* qui fut le premier organisme chez qui la formation d'hétérochromatine via le RNAi a été détectée (Hall et al., 2002; Volpe et al., 2002). Ceci suggère que ces différentes marques épigénétiques ne sont pas nécessairement couplées.

8.1 RdDM

Le premier exemple de modification épigénétique guidé par des ARN fut découvert chez les plantes. En effet, un phénomène de RdDM a été détecté par Wassenegger et al. en 1994 dans des plants de tabac infectés par des viroïdes (Wassenegger et al., 1994). Par la suite, il a été montré que la RdDM nécessite un ARN double-brin clivé en petits ARN de 21-24 nt, indiquant un lien avec la voie du RNAi (Mette et al., 2000). Chez les plantes, les ARN double-brin contenant des séquences homologues à des régions promotrices peuvent induire

la méthylation du promoteur correspondant et son inactivation transcriptionnelle (Jones et al., 2001; Melquist and Bender, 2003; Mette et al., 2000; Sijen et al., 2001b). La RdDM réfère à la méthylation *de novo* des cytosines dans les contextes symétriques et asymétriques. Cette méthylation est confinée à la région d'homologie entre le petit ARN et l'ADN cible (Aufsatz et al., 2002a; Pelissier et al., 1999).

Différentes analyses ont montré que la RdDM requiert des ADN méthyltransférases, des enzymes de modifications des histones, ainsi que d'autres protéines qui fonctionnent dans la voie de l'ARN interférence. Suivant une méthylation *de novo* dirigée par la RdDM, des modifications d'histones permettent de maintenir la méthylation de l'ADN. Chez *Arabidopsis thaliana*, la méthylation CG est maintenue grâce aux activités de MET1 (voir paragraphe 3.1). De plus, MET1 serait requise pour l'établissement complet de la méthylation *de novo* CG dirigée par des ARN (Aufsatz et al., 2004). Par ailleurs, Aufsatz et al. ont suggéré que HDA6 ne serait pas nécessaire à l'établissement de la méthylation *de novo*, mais permettrait de renforcer la méthylation CG (et CNG) induite par des ARN (Aufsatz et al., 2002b).

La méthylation CNG et la méthylation H3K9 de différentes cibles sont maintenues respectivement par CMT3 (voir paragraphe 3.2) et SUVH4 (appelée aussi KYP pour KRYPTONITE) (Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002). SUVH4 n'est pas nécessaire à la méthylation *de novo* : ainsi un gène cible (*PAI2*) devient méthylé et « silencé » dans un contexte mutant *suvh4* par un processus de RdDM (Malagnac et al., 2002). En fait, chez *Arabidopsis thaliana*, la voie de méthylation des CNG et de H3K9 a plutôt été connectée à la voie du RNAi par l'identification du mutant *ago4* (Zilberman et al., 2003). AGO4 est une protéine nucléaire (Xie et al., 2004) qui, avec les autres composants de la machinerie RNAi, DICER-LIKE 3 (DCL3), RDR2 (« RNA-Dependent RNA Polymerase 2 ») et SDE4 (« Silencing Defective 4 » renommée par la suite NRPD1a), établit la méthylation de deux répétitions en tandem dans le promoteur d'un transgène codant FWA et amenant ainsi à son « silencing » (Chan et al., 2004). DCL3 est une des quatre protéines DICER chez *Arabidopsis thaliana* ; elle produit des siRNA de 24 nt qui sont impliqués dans l'induction de modification de la chromatine de transgènes et de plusieurs séquences répétées endogènes chez les plantes (Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2003). AGO4 a aussi un rôle dans la maintenance de la méthylation ADN et de la méthylation H3K9 de plusieurs répétitions endogènes et transgéniques, et dans l'accumulation des siRNA correspondant à ces séquences (Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2003; Zilberman et al., 2004). La figure 13 résume les protéines nécessaires à la RdDM et à sa maintenance.

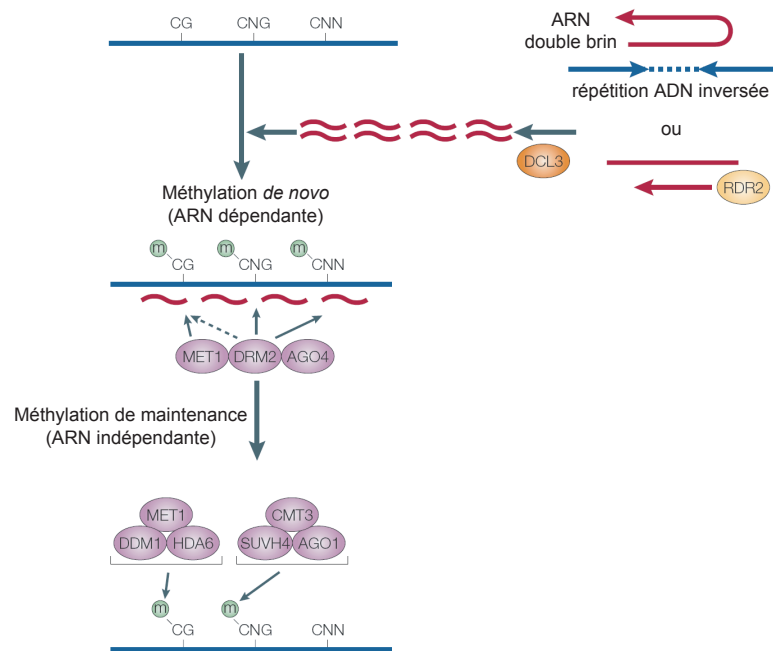


Figure 13: "RNA-directed DNA methylation" (RdDM). Des petits ARN provenant d'ARN double brin clivé par une protéine Dicer (comme DCL3), dirigent la méthylation de l'ADN grâce à MET1 et DRM2. La méthylation de l'ADN peut être alors maintenue par MET1 et CMT3; son maintien nécessite aussi DDM1, HDA6 et SUVH4. Les protéines AGO4 et AGO1 sont impliquées dans la méthylation, respectivement, *de novo* ou de maintenance de certains loci. Les petits ARN sont représentés en rouge; m: groupement méthyle. D'après Matzke et Birchler (2005).

Un crible de mutants défectifs pour la RdDM au niveau d'un promoteur transgénique, a permis d'identifier DRD1 (« Defective in RNA-Directed methylation 1 »), qui est une protéine putative de remodelage de la chromatine SNF2-like (Kanno et al., 2004). Ceci suggère qu'une reconfiguration de la chromatine est peut-être nécessaire pour rendre les cibles ADN accessibles aux signaux ARN. D'ailleurs, une autre protéine SNF2-like, DDM1, contribue à la maintenance de la RdDM (Aufsatz et al., 2002a; Bartee and Bender, 2001; Morel et al., 2000). DDM1, MET1 et HDA6 coopèrent afin de maintenir l'état chromatinien du knob hétérochromatique du chromosome 4 qui contient de nombreuses séquences (e.g. des éléments transposables) produisant des petits ARN (Lippman et al., 2004). DDM1 est requis pour la méthylation et le « silencing » du gène endogène *FWA* qui possède deux répétitions en tandem dans son promoteur (Kinoshita et al., 2004; Soppe et al., 2000). La mise en place de cette méthylation serait due aux siRNA homologues à ces répétitions en tandem, qui sont en fait des transposons (Lippman et al., 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, de nombreux petits ARN sont dérivés de régions non-codantes (Xie et al., 2004), et pourraient potentiellement cibler des modifications épigénétiques au niveau de promoteurs ou d'enhancers.

8.2 RNAi et hétérochromatine

L'implication de la voie RNAi dans la formation d'hétérochromatine a surtout été démontrée chez *Schizosaccharomyces pombe*. Ainsi, la formation de l'hétérochromatine via le RNAi est requise pour une ségrégation correcte des chromosomes ; la protéine Swi6 (homologue de la protéine hétérochromatique HP1 de mammifères) recrute le complexe de cohésines et permet la cohésion des chromatides sœurs au niveau des régions péri-centromériques (Bernard et al., 2001; Volpe et al., 2003). Les études chez *S. pombe*, ont révélé un rôle crucial des composants de la voie RNAi dans l'assemblage de l'hétérochromatine au niveau des centromères et des loci inactivés « mating type » (Hall et al., 2002; Volpe et al., 2002). Des études biochimiques ont identifié le complexe RITS (« RNA-Induced Transcriptional Silencing ») comme utilisant des siRNA pour cibler l'inactivation de régions spécifiques des chromosomes (Verdel et al., 2004). Ce complexe est composé de Chp1 (une protéine hétérochromatique), Ago1 (une protéine ARGONAUTE), Tas3, et de siRNA ; il permet de recruter swi6 au niveau des centromères (Verdel et al., 2004). Le RITS régule aussi la synthèse d'ARN double-brin et de siRNA par le recrutement d'un complexe RDRC (« RNA-Directed RNA polymerase Complex ») aux sites d'assemblage de l'hétérochromatine (Motamedi et al., 2004).

Des mutations des composants du RNAi engendrent une perte d'hétérochromatine au niveau des centromères et une accumulation de transcrits sens et antisens correspondant à des régions spécifiques du centromère (Volpe et al., 2002). *S. pombe* possède un seul gène pour chaque protéine clé de la voie RNAi : DICER (*Dcr1*), ARGONAUTE (*Ago1*), et une RNA-dépendante RNA polymérase (*Rdp1*). La délétion de *dcr1*, *ago1* ou *rdp1* résulte en une perte de « silencing » d'un gène rapporteur intégré au niveau d'un centromère, et à l'absence de méthylation H3K9 et de recrutement de la protéine hétérochromatique Swi6 (Volpe et al., 2002). D'autre part, durant la méiose les télomères se regroupent, mais dans le cas de mutants RNAi, ce regroupement ne se fait pas correctement suggérant un rôle du RNAi dans ce processus (Hall et al., 2003). De plus, les gènes ARNr hautement répétés, adjacents aux télomères du chromosome 3, sont la cible de la méthylation H3K9 dirigée par le RNAi (Cam et al., 2005).

Enfin, le complexe RITS est un lien physique entre le RNAi et l'assemblage de l'hétérochromatine. Verdel et al. ont démontré que les siRNA sont requis pour l'association de RITS avec la chromatine, et ces auteurs suggèrent que RITS utilise les siRNA pour cibler des régions spécifiques des chromosomes (Verdel et al., 2004). Ainsi, tout comme RISC, RITS pourrait utiliser les siRNA pour reconnaître ses cibles, mais contrairement au RISC, RITS agit au niveau nucléaire et initie des modifications de la chromatine.

9. La polymérase IV

En 2005, différents articles ont démontré l'existence d'une polymérase IV chez *Arabidopsis thaliana*, qui avait été prédite suite au séquençage d'*Arabidopsis* (AGI, 2000).

Chez *Arabidopsis*, Dalmay et al. avaient identifié un mutant *sde4* (« silencing defective 4 ») induisant une perte transitoire de « silencing » au niveau de transgènes GFP (Dalmay et al., 2000). Par la suite, il a été montré que la mutation *sde4* induit une diminution des méthylations ADN CNG et asymétriques de différentes séquences cibles, et empêche l'établissement, mais pas la maintenance, de la méthylation CG (Chan et al., 2004). SDE4 correspond en réalité à la grande sous-unité d'une polymérase spécifique des plantes, la polymérase IV (Herr et al., 2005). SDE4 a été renommée NRPD1a (« nuclear RNA polymerase D1a »). Une deuxième sous-unité de la polymérase IV est codée par *NRPD2a*. Les mutations de *NRPD1a* et de *NRPD2a* entraînent une diminution de la méthylation ADN de AtSN1 et de l'ADNr 5S, concomitante à une diminution des siRNA leur correspondant (Hamilton et al., 2002; Herr et al., 2005; Onodera et al., 2005). La polymérase IV serait donc impliquée dans la voie de la RdDM. D'ailleurs, Kanno et al. ont isolé des mutants de la

polymérase IV dans un crible bloquant la RdDM (Kanno et al., 2005). La mutation de *NRPD1a* induit une augmentation des transcrits AtSN1, et donc une levée de son « silencing » (Herr et al., 2005). La diminution de la méthylation de l'ADNr 5S n'explique pas en elle-même la diminution des siRNA 5S, car cette méthylation est également diminuée dans les mutants *met1* et *ddm1* alors que les siRNA 5S sont augmentés (Onodera et al., 2005). D'autre part, dans des noyaux mutants pour la deuxième sous-unité de la polymérase IV (*NRPD2a/b*), l'ADNr 5S est décondensé et la taille des chromocentres (qui sont les structures hétérochromatiques marquées au DAPI dans des noyaux de cellules en interphase) est réduite, en comparaison avec des noyaux sauvages (Onodera et al., 2005). Ceci suggère que la polymérase IV a un rôle dans la condensation de l'hétérochromatine en général, et de l'ADNr 5S en particulier. Cependant, les répétitions centromériques, qui constituent la grande majorité de l'hétérochromatine, ne semblent pas être la cible de la polymérase IV, puisqu'en contexte mutant *nrpd2a/b*, la méthylation ADN ainsi que la condensation de ces répétitions ne varient pas (Onodera et al., 2005).

Deux autres articles ont montré qu'*Arabidopsis* possède deux formes d'ARN polymérase IV, RNAPIVa (« RNA polymerase IVa », dont NRPD1a et NRPD2a sont des composants) et RNAPIVb (dont NRPD1b et NRPD2a font partie) (Kanno et al., 2005; Pontier et al., 2005). D'après ces articles, NRPD1a et NRPD1b n'ont pas de fonction redondante dans la RdDM (Kanno et al., 2005), et un « silencing » efficace au niveau de certaines cibles comme des transposons et l'ADNr 5S, nécessite l'action des deux formes de la polymérase IV, alors que le « silencing » de séquences peu répétées ne requiert que la polymérase RNAPIVa (Pontier et al., 2005).

Un modèle ressort de toutes ces études dans lequel la RNAPIVa serait requise pour la production et/ou l'amplification des siRNA, alors que la RNAPIVb agirait en aval de la formation des petits ARN et permettrait de convertir ces signaux ARN en des modifications de la chromatine, grâce à un mécanisme encore inconnu.

Un des paradoxes du concept de « silencing » transcriptionnel dirigé par des ARN, est qu'une transcription du locus « silencé » (permettant la production des petits ARN) est nécessaire justement à ce « silencing ». La découverte des polymérases IV permet de résoudre en partie ce paradoxe : la production des petits ARN serait dépendante d'une ARN polymérase autre que celles permettant l'expression de séquences actives (polymérases I, II, et III).

Chapitre III

Modifications post-traductionnelles des histones

Malgré le caractère essentiel de la méthylation de l'ADN chez les organismes qui ont développé cette marque épigénétique, celle-ci n'est pas ou peu trouvée chez certains organismes (la levure, la drosophile, *C. elegans*) qui pourtant subissent des régulations épigénétiques. En réalité, les protéines de la chromatine peuvent également porter une information épigénétique. Au niveau de la chromatine, l'ADN est enroulé autour d'octamères d'histones formant des structures appelées nucléosomes. Un octamère d'histones est composé de deux molécules de chaque protéine histone H2A, H2B, H3 et H4 ; leurs extrémités N-terminales formant des queues sortant des domaines globulaires (Luger et al., 1997). L'ADN « linker » connecte les octamères d'histones voisins, et sert de site de liaison à l'histone H1 (Zhou et al., 1998). Pendant de nombreuses années, le rôle assigné aux histones était cantonné à leur fonction de compaction de l'ADN. Cependant, il est à présent très clair que les nucléosomes contribuent à la dynamique de remodelage de la chromatine durant l'activation ou la répression des gènes, et portent une information épigénétique importante. Cette information réside au niveau des « queues » des histones qui sont sujettes à de nombreuses modifications covalentes, comme l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, et l'ADP-ribosylation (Berger, 2002; Jenuwein and Allis, 2001). Toutes ces modifications post-traductionnelles constituent ce qui a été appelé le code histone (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000; Turner, 2002), chaque modification ou la combinaison de plusieurs d'entre elles définissant un état actif ou réprimé de la chromatine.

Un nombre considérable de modifications post-traductionnelles des histones ont été identifiées. Ainsi, treize résidus lysine des « queues » N-terminales peuvent être acétylés de façon réversible au niveau des histones H2A, H2B, H3 et H4 ; trois résidus sérine des histones H3 et H4 peuvent être phosphorylés ; six lysines et trois arginines des histones H3 et H4 peuvent être méthylées ; et deux résidus dans les domaines C-terminaux des histones H2A et H2B peuvent être ubiquitinés (Jenuwein and Allis, 2001; Lachner et al., 2003). Seules quelques modifications des histones seront traitées dans ce manuscrit.

1. Acétylation/déacétylation des histones

Les histones sont acétylées par des histones acétyltransférases (HAT) utilisant l'acétyl-CoA comme donneur de groupements acétyles ; cette modification peut être retirée par des histones déacétylases (HDAC). L'hyperacétylation relâche la structure de la chromatine et active l'expression de gènes, alors que l'hypoacétylation induit une compaction de la chromatine et la répression de gènes.

Chez les plantes, des analyses de séquences ont permis de distinguer trois familles de HAT : la famille GNAT/MYST, la famille p300/CBP, et la famille TAF_{II}250 (Pandey et al., 2002). Chez *Arabidopsis*, l'histone acétyltransférase GCN5 est associée avec la protéine ADA2 qui est un adaptateur transcriptionnel ; la mutation de ADA2 ou de GCN5 provoque des effets importants sur la croissance, le développement et l'expression de certains gènes (Vlachonasios et al., 2003). L'acétylation des histones a également un rôle essentiel au niveau de la différenciation cellulaire. Chez le pois, l'augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 au niveau d'un promoteur d'un gène régulé par la lumière codant la plastocyanine, a été corrélée avec une activité transcriptionnelle en réponse à la lumière (Chua et al., 2001).

Trois familles de HDAC ont été identifiées chez les plantes : la famille RPD3/HDA, la famille SIR2, et la famille HD2 (Pandey et al., 2002). La famille HD2 est spécifique aux plantes et ne ressemble pas aux autres classes de HDAC (Dangl et al., 2001; Lusser et al., 1997). L'inhibition de l'expression de HDAC de type RPD3 induit des défauts de croissance et de développement chez *Arabidopsis* (Tian and Chen, 2001; Tian et al., 2003; Wu et al., 2000) ; par exemple, la mutation de AtHD1 induit l'expression ectopique du gène *SUPERMAN* (Tian and Chen, 2001). D'autre part, AtHDA6, évoquée dans le chapitre II, appartient aussi à la famille RPD3, et est responsable du « silencing » de transgènes, d'éléments transposables, et de l'ADNr (Aufsatz et al., 2002b; Lippman et al., 2003; Murfett et al., 2001; Probst et al., 2004).

2. Méthylation de l'ADN et déacétylation des histones

Deux voies indépendantes ont été découvertes chez les vertébrés, connectant la méthylation de l'ADN (5mC) avec la déacétylation des histones. La première utilise des protéines qui se lient aux cytosines méthylées ; c'est le cas des protéines MBD (« Methyl Binding Domain ») et des protéines MeCP (« methyl-CpG-binding protein »), qui servent d'adaptateurs entre la méthylation ADN et les complexes histones déacétylases (Jones et al., 1998; Ng et al., 1999). Plusieurs complexes MBD/MeCP-HDAC ont été identifiés dans des cellules de mammifères (Dobosy and Selker, 2001). Ces complexes agissent localement pour réduire l'acétylation des histones en se guidant grâce aux 5mC de l'ADN. Une deuxième voie, également découverte chez les mammifères, consiste en une interaction physique entre l'ADN méthyltransférase de maintenance DNMT1 et des HDAC (Robertson et al., 2000; Rountree et al., 2000).

Inversement, l'état d'acétylation des histones peut influencer la méthylation de l'ADN. Ainsi, l'utilisation de trichostatine A (TSA) qui est un inhibiteur des HDAC, induit une hypométhylation des cytosines de séquences spécifiques chez *Neurospora*, et chez les mammifères (Santoro and Grummt, 2005; Selker, 1998). De même dans des plantes *Arabidopsis* mutantes *hda6*, la méthylation ADN de transgènes, d'éléments transposables, et de l'ADNr est diminuée (Aufsatz et al., 2002b; Lippman et al., 2003; Probst et al., 2004). Très récemment, Earley et al. ont découvert que HDA6 est impliquée dans le maintien de l'hyperméthylation ADN des promoteurs des gènes ADNr « silencés » par le phénomène de dominance nucléolaire chez *Arabidopsis* (Earley et al., 2006).

3. Méthylation des histones

Les histones H3 et H4 associées à l'euchromatine et à l'hétérochromatine portent des marques de méthylation différentes (tableau 3). Les marques de méthylation des histones spécifiques de l'hétérochromatine et leur implication dans le gene « silencing » ont d'abord été étudiées chez la drosophile et les mammifères (Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002). Les marques de méthylation associées aux histones de l'hétérochromatine les plus étudiées se trouvent au niveau de H3K9, H3K27 et H4K20, ces lysines pouvant être mono-, di- ou triméthylées (tableau 3).

Une fonction centrale dans le contrôle de la formation de l'hétérochromatine et le gene « silencing » a été identifiée par l'isolement du gène *Su(var)3-9* chez la drosophile (Tschiersch et al., 1994), et la démonstration de l'activité H3K9 méthyltransférase de l'histone H3K9 méthyltransférase correspondante (Rea et al., 2000; Schotta et al., 2002). Des protéines orthologues de *Su(var)3-9* ont été identifiées chez *S. pombe* (*Clr4*) (Ekwall et al., 1996; Ivanova et al., 1998), *Neurospora crassa* (*DIM5*) (Tamaru and Selker, 2001), et chez les mammifères (*SUV39H1* et *SUV39H2*) (Aagaard et al., 1999; O'Carroll et al., 2000).

Chez *Arabidopsis thaliana*, dix gènes codant des homologues de *SU(VAR)3-9* ont été identifiés (*SUVH1* à *SUVH10*) (Baumbusch et al., 2001). Les effets des protéines SUVH sur la méthylation des histones H3 et H4 ont été étudiés par des analyses d'immunocytologie et en western blots (Jackson et al., 2002; Lindroth et al., 2004; Naumann et al., 2005). De plus, l'activité H3K9 méthyltransférase a été montrée *in vitro* pour les protéines SUVH2, SUVH4, SUVH6 et SUVH5 (Ebbs and Bender, 2006; Jackson et al., 2004; Jackson et al., 2002; Naumann et al., 2005). Des mutations de *SUVH2* réduisent la mono- et la diméthylation H3K9 (H3K9me1 et H3K9me2) ainsi que H3K27me1 et H3K27me2 (Naumann

	euchromatine	hétérochromatine
mammifères	H3K9 mono, diméthylation H3K4 mono, di, triméthylation	H3K9 triméthylation H3K27 monométhylation H4K20 triméthylation
drosophile	H3K27 mono, di, triméthylation (marque de silencing)	H3K27 mono, di, triméthylation H3K9 diméthylation H4K20 triméthylation
<i>Arabidopsis</i>	H3K4 mono, di, triméthylation H3K9 triméthylation H3K27 triméthylation H4K20 di, triméthylation	H3K9 mono, diméthylation H3K27 mono, diméthylation H4K20 monométhylation

Tableau 3 : Différentes méthylations euchromatiques et hétérochromatiques des histones H3 et H4 chez les mammifères, la drosophile et *Arabidopsis*.

et al., 2005), qui sont quatre marques hétérochromatiques. Au contraire, des mutations perte de fonction de SUVH1 n'induisent aucune réduction de la méthylation H3K9 (Naumann et al., 2005). Le rôle clé de SUVH2 dans le contrôle de l'hétérochromatine a été aussi démontré par la surexpression de cette protéine qui induit la formation d'hétérochromatine ectopique ainsi qu'une augmentation de H3K9me1, H3K9me2 et H3K27me1, H3K27me2 et une diminution de marques euchromatiques (Naumann et al., 2005).

D'autre part, des mutations de *SUVH4* (aussi appelé *KYP*, voir paragraphe 8.1 du chapitre II) permettent la suppression du « silencing » de *SUPERMAN* ainsi que la réactivation de l'expression de plusieurs rétrotransposons initialement « silencés » (Jackson et al., 2002). De plus, les mutations de *KYP* réduisent la méthylation H3K9me2 et moindrement la méthylation H3K9me1 de différentes cibles (Jackson et al., 2004; Johnson et al., 2002).

Les protéines SU(VAR)3-9 sont conservées au cours de l'évolution et leur activité H3K9 méthyltransférase contrôle la formation d'hétérochromatine chez *S. pombe* (Nakayama et al., 2001). Chez *Arabidopsis*, Naumann et al. ont montré que la surexpression de SUVH2 induit une hétérochromatinisation ectopique et en concluent que cette H3K9 méthyltransférase a un fort impact sur la formation de l'hétérochromatine (Naumann et al., 2005). Ces auteurs suggèrent que SUVH2 possède un rôle clé dans la formation de l'hétérochromatine ; il paraît étonnant que ces auteurs n'aient pas observé de réduction de la fraction hétérochromatique dans des noyaux de mutants perte de fonction de SUVH2, alors que cette mutation induit une forte diminution du taux global d'histones H3K9me1 et H3K9me2. De même, Jasencakova et al. ont observé que dans des noyaux de plantes mutantes *kyp* (*suvh4*), la méthylation H3K9me2 de l'hétérochromatine (c'est-à-dire les chromocentres dans des noyaux en interphase) est fortement réduite alors que la fraction hétérochromatique n'est pas diminuée ; le pourcentage d'hétérochromatine est au contraire légèrement augmentée (Jasencakova et al., 2003). Ceci est en accord avec des données chez la drosophile et les mammifères, chez qui des mutants de H3K9 méthyltransférases induisent une forte diminution de la méthylation H3K9 au niveau de l'hétérochromatine sans affecter la formation de l'hétérochromatine elle-même (Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002). Toutes ces données amènent à se demander si une méthylation H3K9 élevée est importante pour l'assemblage de l'hétérochromatine constitutive, et si tel est le cas, comment ceci est compensé dans les mutants H3K9 méthyltransférases.

Jusqu'à récemment, la méthylation des histones était considérée comme une marque très stable qui ne pouvait être éliminée de façon active. En réalité, il a été démontré chez les

mammifères que des histones déméthylases existent comme LSD1 qui déméthyle H3K4 (Kubicek and Jenuwein, 2004; Wysocka et al., 2005), JHDM2A (Klose et al., 2006; Yamane et al., 2006), JMJ2B et JMJ2C (Cloos et al., 2006) qui sont trois déméthylases agissant sur H3K9.

4. Méthylation ADN/méthylation des histones

Il est admis que la combinaison de la méthylation ADN et des modifications d'histones déterminent la structure de la chromatine et la capacité pour une séquence donnée à être transcrite.

Dans des plantes mutantes *met1* et *ddm1*, codant des protéines importantes pour la maintenance de la méthylation ADN (voir sections 3.1 et 4 du chapitre II), la réduction de la taille des chromocentres hétérochromatiques est accompagnée par une forte diminution de H3K9me2 au niveau de ces chromocentres (Soppe et al., 2002). Ces auteurs ont aussi détecté par immunolocalisation, une dispersion de la méthylation ADN dans ces noyaux mutants qui n'est alors plus concentrée au niveau des chromocentres comme dans des noyaux sauvages. Une autre étude a montré que dans des plantes mutantes *ddm1*, différentes séquences, dont des éléments transposables, perdent leur méthylation H3K9me2 (Gendrel et al., 2002). D'autre part, dans un mutant nul *met1*, différentes cibles normalement « silencées » perdent leur méthylation H3K9me2 et deviennent actives; de plus, dans ces noyaux mutants *met1*, la méthylation H3K9me2 est redistribuée hors des chromocentres alors que le taux global de cette méthylation n'est pas affectée (Tariq et al., 2003). Ces données suggèrent que la méthylation ADN CG dirige la diméthylation H3K9 au niveau des chromocentres, et l'altération de la méthylation ADN est accompagnée par une relaxation des chromocentres hétérochromatiques.

Si la méthylation ADN influence la méthylation des histones, le contraire est également vrai. La méthylation H3K9 peut diriger la méthylation ADN CNG (Jackson et al., 2002; Johnson et al., 2002). Ainsi, des mutants *kyp* et *cmt3*, (CMT3 est l'ADN méthyltransférase CNG de maintenance; voir section 3.2, chapitre II), ont une perte de la méthylation CNG (Jackson et al., 2002). Lindroth et al. ont suggéré que les histones H3K9me2 et H3K27me2 sont requises pour recruter CMT3 au niveau de ses cibles (Lindroth et al., 2004); ceci montre l'importance du code histone, la combinaison de différentes méthylations des histones permettant de diriger indirectement la méthylation ADN. Une étude de l'interaction fonctionnelle de SUVH2 a révélé que le « silencing » induit par cette histone méthyltransférase requiert MET1 (et DDM1) mais pas CMT3

(Naumann et al., 2005) ; l'activité répressive de SUVH2 nécessiterait donc une méthylation ADN CG.

Certaines marques de méthylation associées aux histones sont indépendantes de la méthylation ADN ; par exemple, la distribution de H3K27me1 et H3K27me2 n'est pas influencée par la méthylation ADN CG (Mathieu et al., 2005).

5. Méthylation ADN/méthylation et acétylation des histones

Nous avons vu que la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones sont connectées, et que la méthylation de l'ADN et la méthylation des histones s'influencent également l'une l'autre. De façon logique, nous allons voir que ces trois types de marques sont effectivement interconnectés.

Chez *Arabidopsis*, Lippman et al. ont montré qu'une mutation de *HDA6* induit une réactivation de la transcription de différents éléments transposables, accompagnée d'une diminution de méthylation ADN et de méthylation H3K9me2 (Lippman et al., 2003). Deux transposons présentent également une augmentation de leur méthylation H3K4me2 (Lippman et al., 2003). La mutation d'une autre HDAC (appartenant à la famille RPD3), *AtHD1*, induit comme attendu une augmentation de l'acétylation des histones, mais aussi une diminution de H3K9me2 (Tian et al., 2005). De plus, dans des plantes mutantes *hda6*, l'ADNr perd de la méthylation ADN, et devient hyperacétylé au niveau des histones H4, hyperméthylé au niveau de H3K4, et apparaît décondensé dans noyaux en interphase (Probst et al., 2004). Dans des plantes *Arabidopsis* hybrides allotétraploïdes (*Arabidopsis suecica*), l'ADNr subit un phénomène de dominance nucléolaire qui « silence » l'ADNr provenant du parent *Arabidopsis thaliana* alors que l'ADNr provenant du parent *Arabidopsis arenosa* est actif (Pikaard, 2000). Dans des plantes allotétraploïdes mutantes *hdt1* (une HDAC appartenant à la famille HD2), l'association des gènes ADNr de *thaliana* avec H3K9me2 diminue au profit d'une association avec H3K4me3, et ceci s'accompagne par une réduction de la méthylation ADN de leurs promoteurs et une levée de leur « silencing » (Lawrence et al., 2004). De plus, la perte de la diméthylation H3K9 dans ces plantes mutantes est accompagnée par une augmentation de l'acétylation H3K9 (Lawrence et al., 2004). De la même manière, dans des allotétraploïdes *Arabidopsis suecica* mutants *hda6*, l'ADNr d'*Arabidopsis thaliana* subit les mêmes changements de modifications d'histones et une hypométhylation ADN, accompagnés de l'activation d'expression de ces gènes (Earley et al., 2006).

Ces études montrent la connection qui existe entre différentes marques associées aux histones (acétylation et méthylation), la méthylation de l'ADN, et l'activité transcriptionnelle de séquences cibles ; ceci laisse apercevoir la complexité du code épigénétique.

Objectifs de la thèse

Les gènes d'ARNr 5S sont localisés dans l'hétérochromatine péricentromérique et malgré cette position dans le génome, ils font partie des gènes les plus transcrits dans les cellules. Il est donc important de comprendre comment ces gènes, dans ce contexte théoriquement répressif, parviennent à être exprimés.

Comme décrit dans la partie bibliographique de ce manuscrit (chapitre I, section 5.1), TFIIA est le facteur spécifique des gènes d'ARNr 5S et a été identifié chez différents organismes mais aucun TFIIA n'avait été cloné et caractérisé chez les plantes. Dans le cadre de l'étude de l'expression des gènes d'ARNr 5S d'*Arabidopsis thaliana* initié au laboratoire, il nous paraissait important d'isoler et de caractériser ce facteur de transcription.

D'autre part, nous avons évoqué que seule une partie des gènes d'ARNr 5S est exprimée : le locus du chromosome 4 et le grand locus du chromosome 5 peuvent être transcrits contrairement aux gènes appartenant au petit locus du chromosome 5 et au chromosome 3 (Cloix et al., 2002). De plus, les gènes appartenant aux loci 5S actifs ne sont pas tous exprimés : certains portent des mutations dans leurs séquences promotrices (Cloix et al., 2003) alors que d'autres gènes seraient éteints épigénétiquement (voir section 7 du premier chapitre de la partie bibliographie). Il existe deux populations d'ARNr 5S dans les cellules d'*Arabidopsis thaliana*, les ARN majoritaires et les ARN minoritaires (portant une ou deux substitutions de bases par rapport aux ARN majoritaires) (Cloix et al., 2002). Les ARN minoritaires sont peu représentés *in vivo* malgré de nombreux gènes leur correspondant et leur capacité à être transcrits. Nous voulions donc définir les déterminants épigénétiques réprimant l'expression de ces gènes, essentiellement par l'utilisation de mutants épigénétiques.

Résultats des travaux de thèse

Article n°1

« Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana* »

Mathieu, O., Yukawa, Y., Prieto, J.L., **Vaillant, I.**, Sugiura, M. and Tourmente, S. (2003) *Nucleic Acids Res*, **31**, 2424-2433.

Dans le cadre de l'étude de l'expression des gènes d'ARNr 5S d'*Arabidopsis thaliana*, il paraissait important d'isoler le facteur de transcription spécifique des gènes d'ARNr 5S, TFIIA. Comme évoqué dans la synthèse bibliographique, la caractéristique commune retrouvée parmi les TFIIA isolés dans différents organismes est la présence de neuf doigts de zinc de type Cys₂-His₂. La recherche d'une protéine possédant neuf doigts de zinc dans les banques de données d'*Arabidopsis* a permis l'identification d'une seule protéine. L'ADNc correspondant a été amplifié à partir d'une banque d'ADNc de cellules d'*Arabidopsis*, et utilisé pour produire deux protéines recombinantes en bactérie : une protéine de fusion avec la Glutathion S-Transférase (GST) et une protéine de fusion avec la GFP (« Green Fluorescent Protein »).

Il avait été décrit pour certains TFIIA caractérisés, que cette protéine est capable de lier l'ADNr 5S ainsi que l'ARNr 5S. Nous avons donc procédé à des retards sur gel et constaté que TFIIA putatif d'*Arabidopsis thaliana* (AtTFIIA) possède ces propriétés. D'autre part, la liaison de la protéine ribosomale L5 à l'ARNr 5S a été décrite chez différents organismes. Afin de posséder un contrôle positif de liaison de l'ARNr 5S, nous avons identifié et produit la protéine L5 d'*Arabidopsis* (AtL5), et montré que cette protéine lie effectivement l'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*.

De plus, la transfection transitoire de protoplastes avec des constructions de fusion AtL5-GFP et AtTFIIA-GFP, nous ont permis d'étudier la localisation cellulaire de ces protéines.

En collaboration avec le laboratoire du Pr. M. Sugiura (Nagoya, Japon), nous avons montré que la protéine AtTFIIA est capable de stimuler la transcription d'un gène d'ARNr 5S *in vitro* dans le système de transcription POL III de cellules BY-2 de tabac.

Toutes ces données nous ont permis d'affirmer que nous avons isolé le facteur de transcription TFIIA d'*Arabidopsis*.

Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*

Olivier Mathieu, Yasushi Yukawa¹, José-Luis Prieto, Isabelle Vaillant, Masahiro Sugiura¹ and Sylvette Tourmente*

UMR CNRS 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France and ¹Graduate School of Natural Science, Nagoya City University, Nagoya 467-8501, Japan

Received November 28, 2002; Revised February 24, 2003; Accepted March 5, 2003

DDBJ/EMBL/GenBank accession nos*

ABSTRACT

Thus far, no transcription factor IIIA (TFIIIA) from higher plants has been cloned and characterized. We have cloned and characterized TFIIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. Primary sequence comparison revealed a high divergence of AtTFIIIA and a relatively high conservation of AtL5 when compared with other organisms. The AtTFIIIA cDNA encodes a protein with nine Cys₂-His₂-type zinc fingers, a 23 amino acid spacer between fingers 1 and 2, a 66 amino acid spacer between fingers 4 and 5, and a 50 amino acid non-finger C-terminal tail. Aside from the amino acids required for proper zinc finger folding, AtTFIIIA is highly divergent from other known TFIIAs. AtTFIIIA can bind 5S rDNA, as well as 5S rRNA, and efficiently stimulates the transcription of an *Arabidopsis* 5S rRNA gene *in vitro*. AtL5 identity was confirmed by demonstrating that this protein binds to 5S rRNA but not to 5S rDNA. Protoplast transient expression assays with green fluorescent protein fusion proteins revealed that AtTFIIIA is absent from the cytoplasm and concentrated at several nuclear foci including the nucleolus. AtL5 protein accumulates in the nucleus, especially in the nucleolus, and is also present in the cytoplasm.

INTRODUCTION

Ribosome biogenesis in eukaryotic cells requires the synthesis of RNAs by all three nuclear RNA polymerases. RNA polymerase II (pol II) produces mRNAs that encode ribosomal proteins, while the 5.8S, 18S and 28S rRNAs are co-transcribed in the nucleolus by RNA polymerase I. Transcription factor IIIA (TFIIIA) is pol III transcription factor specifically required for transcription of 5S rRNA genes. It binds to the internal control region of the 5S rRNA genes as the

first step in the assembly of a transcription complex, allowing the recruitment of TFIIC, TFIIIB and pol III (1,2).

TFIIIA has been studied extensively in *Xenopus laevis* where it was first isolated from oocytes (3). Analysis of TFIIIA sequences from several species including *X.laevis* (3) and other frog species (4,5), human (6), catfish (7), mouse, rat (8), *Saccharomyces cerevisiae* (9) and *Schizosaccharomyces pombe* (10) has revealed remarkably poor conservation of primary sequence. All known TFIIAs, except in *S.cerevisiae* and *S.pombe*, have a similar organization: nine consecutive zinc fingers of the Cys₂-His₂ type, followed by a C-terminal domain of unknown structure required for the support of transcription of 5S rRNA genes in *X.laevis* (11). The *S.cerevisiae* TFIIIA protein bears an 81 amino acid spacer insertion between zinc fingers 8 and 9. In *S.pombe*, TFIIIA contains an unprecedented tenth zinc finger. TFIIIA has been shown to bind to the 5S rRNA in *Acanthamoeba castellanii* (12) and *X.laevis*, where it is involved in a network of interactions that couple 5S rRNA synthesis to accumulation of ribosomal proteins (13). Purified proteins containing TFIIIA activity, isolated from tulip (14) and maize (15), have also been shown to bind 5S rRNA.

Ribosomal protein L5 is also known to bind specifically to 5S rRNA and is involved in its nucleocytoplasmic transport (16–19). After transcription, 5S rRNA binds either to its own transcription factor IIIA or to ribosomal protein L5, forming 7S or 5S ribonucleoprotein particles (RNPs), respectively [reviewed in Pieler and Rudt (20)]. It has been suggested that the 5S RNP acts as a precursor to ribosome assembly by delivering 5S rRNA from the nucleoplasm to the nucleolar assembly site of 60S pre-ribosomal subunits (21).

Studies in *X.laevis* oocytes have shown that 5S rRNA can be exported from the nucleus to the cytoplasm, for storage (16,22). Pre-vitellogenic oocytes of amphibians and fish accumulate two major RNP particles, the 7S RNP and the 42S RNP. The 42S RNP is composed of various tRNAs and oocyte-specific 5S rRNA, along with two proteins, p50 and p43, a 5S rRNA-binding protein (23,24). In fully grown oocytes, 7S and 5S RNPs migrate out of the nucleus and accumulate in the cytoplasm (16,22). 5S rRNA must then re-enter the nucleus to ensure that the ribosome can be fully

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 4 73 40 74 01; Fax: +33 4 73 40 77 77; Email: sylvette.tourmente@geem.univ-bpclermont.fr

+AY186610, AC069273, AAG51140, AY081701, AY186611

assembled (21,25). The nuclear re-entry of 5S rRNA is mediated exclusively by the ribosomal protein L5 (26–28). The most plausible interpretation for cytosolic export of 5S rRNA in *X.laevis* may lie in control of 5S rRNA synthesis, as suggested by the current view of the feedback regulation mechanism (13). Cytoplasmic storage sites for 5S rRNA have not been observed in mammalian somatic cells.

To date, no TFIIIA from higher plants has been cloned and characterized. We have identified, cloned and characterized TFIIIA and L5 from *Arabidopsis thaliana*. Primary sequence comparison revealed a high divergence of *At*TFIIIA and a relatively high conservation of *At*L5 compared with other organisms. As previously shown in *Xenopus*, we have demonstrated that *At*TFIIIA can bind to 5S rDNA, as well as to 5S rRNA, the gene product. *At*TFIIIA is able to stimulate the transcription of an *Arabidopsis* 5S rRNA gene *in vitro*. *At*L5 identity was confirmed by showing that this protein binds to 5S rRNA but not to 5S rDNA. Protoplast transient expression assays with green fluorescent protein (GFP) fusion proteins indicate that *At*L5 protein accumulates in the nucleus and in the nucleolus. *At*L5 is also present in the cytoplasm, probably incorporated in the large ribosomal subunit in association with 5S rRNA. *At*TFIIIA is only detected in the nucleus, with a strong accumulation in the nucleolus and at additional foci, suggesting that *At*TFIIIA can be imported efficiently from the nucleoplasm into the nucleolus. We assume that the additional foci found in the nucleoplasm represent accumulation of *At*TFIIIA on transcribed 5S rDNA loci or into Cajal bodies.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the *Arabidopsis* TFIIIA cDNA and purification of recombinant protein

A cDNA encoding the putative *Arabidopsis* TFIIIA homolog was amplified by PCR from an *Arabidopsis* cDNA library (29) using primers designed according to the *Arabidopsis* sequence database. The direct primer (5'-ATCATAGGATCCTGGCG-GAAGAAGCTAAAG-3') and reverse primer (5'-ATTACAGGATCCCTAGCAAGTTTCGTG-3') included an *Bam*HI restriction site (underlined). After PCR amplification and *Bam*HI digestion, the coding sequence of TFIIIA was cloned into the pGEX-5X-1 expression vector (Amersham Biosciences). In the resulting construct named pGEX-*At*TFIIIA, *At*TFIIIA is fused to the C-terminal end of GST. Prior to expression in bacteria, sequencing was performed to verify the sequence of the cDNA and the translational fusion.

To express the *At*TFIIIA recombinant protein, pGEX-*At*TFIIIA was transformed into *Escherichia coli* BLR (DE3) cells. A fresh 2 ml starter culture of BLR (DE3)/pGEX-*At*TFIIIA was used to inoculate 200 ml of LB containing 100 µg/ml ampicillin and 12.5 µg/ml tetracycline. The culture was grown at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.3–0.4. Recombinant protein expression was then induced by addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) followed by an incubation of 2–3 h at 30°C. Induction was verified by SDS-PAGE analysis followed by Coomassie blue staining. Induced cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 15 min at 4°C, and resuspended in 1 ml of ice-cold buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl). Cell lysis was

performed by addition of 100 µg/ml lysozyme, followed by a 15 min incubation at 30°C and sonication. Soluble cell extract containing *At*TFIIIA was recovered by centrifugation at 12 000 g at 4°C for 30 min, and saved at 4°C for purification.

The extracts containing the GST-*At*TFIIIA recombinant protein or GST were mixed with glutathione-agarose (Sigma) for 30 min at room temperature, and unbound protein was removed by three washes in 1 M NaCl and three washes in 1× phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, bound protein was removed by elution with 10 mM reduced glutathione pH 7.6 (Sigma). Eluates were analyzed by SDS-PAGE.

Isolation of the *Arabidopsis* L5 cDNA and purification of recombinant protein

As for *At*TFIIIA, the cDNA encoding the *Arabidopsis* L5 homolog was amplified by PCR from the *Arabidopsis* cDNA library, using primers designed according to the L5 cDNA sequence present in the database (accession no. AY081701). The direct primer (5'-ATTCTATGAATTCCTGGTGTGTTGTG-3') and reverse primer (5'-ATTCTATGAATTCCTAC-TCTTCATCG-3') included an *Eco*RI restriction site. After PCR amplification and *Eco*RI digestion, the L5 cDNA was cloned into the pGEX-5X-1 expression vector. In the resulting construct named pGEX-*At*L5, *At*L5 is fused to the C-terminal end of GST. Prior to expression in bacteria, sequencing was performed to check the sequence of the cDNA (accession no. AY186611) and the translational fusion.

Expression and purification of the GST-*At*L5 recombinant fusion protein were as described above for *At*TFIIIA, except that cells were grown at 37°C after induction with 1 mM IPTG.

DNA gel retardation assays

The 238 bp *Nor*I fragment of pGEMT-5S containing the transcribed region and a part of the spacer sequence of an *A.thaliana* 5S rRNA gene was labeled by a fill-in reaction performed with 25 µCi of [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), 100 µM each dATP, dGTP and dTTP, 1× Klenow buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT)], 100 ng of the 5S DNA fragment and 25 U of Klenow fragment (Amersham). After a 30 min incubation at room temperature, the labeled fragment was purified with a PCR purification kit (Qiagen).

Recombinant proteins (see legends to figures for concentrations) were incubated with 1 µl (20 000 c.p.m., 1–3 ng, ~1 nM) of the labeled 5S rDNA fragment and variable concentrations of unlabeled DNA in 20 µl reactions containing buffer EMSA (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 7 mM MgCl₂, 10 µM ZnCl₂, 1 mM DTT, 10% glycerol, 70 mM KCl) supplemented with 10 µg/ml poly(dI-dC) and 100 µg/ml bovine serum albumin (BSA). Unlabeled DNA referred to as 'specific' is the 238 bp *Nor*I fragment of pGEMT-5S, while 'non-specific' refers to a 490 bp *Eco*RI fragment from the plasmid pGEMT-APT1 that contains the cDNA of the adenine phosphoribosyl-transferase (*APT1*) gene (30). The reaction mixtures were incubated at 25°C for 30 min and then quickly cooled on ice before addition of 3 µl of loading buffer [50% (v/v) glycerol, 1 mg/ml bromophenol blue]. The samples were loaded onto an 8% polyacrylamide gel containing 5% glycerol in 25 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM glycine. Prior to loading, the gels were pre-run at 50 V for 30 min. After loading, electrophoresis

was continued for an additional 2 h at 140 V at room temperature. The gels were dried, and visualized on a PhosphorImager.

RNA gel retardation assays

The transcribed sequence of an *A.thaliana* 5S rRNA gene was fused to a T7 promoter by PCR. Labeled 5S rRNA was then synthesized *in vitro* using the SP6/T7 transcription kit (Roche), following the manufacturer's instructions. Non-specific RNA was generated similarly using the first 120 bp of the *APT1* cDNA fused to a T7 promoter. Transcripts were separated on an 8% acrylamide gel containing 7 M urea, and RNAs were eluted from the gel by an overnight incubation at 37°C in elution buffer (0.5 M ammonium acetate, 1 mM EDTA, 0.2% SDS). After ethanol precipitation, RNAs were resuspended in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. Before use in the gel retardation assays, the RNA probes were incubated for 10 min at 65°C in renaturation buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂) and allowed to cool slowly to room temperature. RNA gel retardation assays were then performed according to the procedure described above for DNA gel retardation.

DNase I footprinting assay

For footprinting of the template strand, 5'-labeled 5S rDNA was generated by PCR using primers OLIGO5 (5'-TAT-ATACGATGGCATTGCATATAC-3') and ³²P-labeled 1037PE-rev ([³²P]5'-GGAAACAGCTATGACCATGGAGG-GATGCAACACGAGGAC-3') from a 5S rDNA transcribed unit (1037). For footprinting of the RNA-like strand, 5'-labeled OLIGO5 primer was used instead of labeled 1037PE-rev. Binding was performed in a 50 µl volume containing 30 mM HEPES-KOH pH 7.9, 3 mM MgSO₄, 80 mM KOAc, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% glycerol, 0.8 µg of poly(dI-dC)-poly(dI-dC), 0.15 pmol of labeled 168 bp double-stranded DNA including the -28 to +120 region of 5S rDNA, and ~400 ng of recombinant protein (GST or GST-ArTFIIIA). After incubation for 15 min at room temperature, 5 µl of Ca²⁺/Mg²⁺ solution (5 mM CaCl₂ and 10 mM MgCl₂) was added, and then 0.33 U of DNase I was added to the mixture and incubated for just 1 min at room temperature. After phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, the ³²P-labeled fragments were separated on an 8% polyacrylamide gel containing 7 M urea and TBE. Radioactivity was detected using a Bio-Imaging Analyzer BAS-2000 II (Fuji Photo Film, Japan).

In vitro transcription assays

In vitro transcription reactions from *Arabidopsis* 5S rDNA in tobacco nuclear extracts were done as previously described (31) with minor modifications. Briefly, the reaction was performed in a 20 µl volume containing 30 mM HEPES-KOH pH 7.9, 3 mM MgSO₄, 80 mM KOAc, 0.1 mM EGTA, 2 mM DTT, 10% glycerol, 0.5 mM each of ATP, CTP, UTP, 25 mM GTP, 120 kBq of [α -³²P]GTP, 0.2 pmol of circular plasmid containing 5S rDNA, 0.5 µg/ml α -amanitin and ~50 µg of tobacco nuclear extract. After adding ~50, 100 and 200 ng each of recombinant protein (GST-ArTFIIIA or GST), the mixture was kept on ice for 10 min, then tobacco nuclear extract was added and incubated on ice for 10 min. The reaction was initiated by addition of NTPs and then incubated

at 28°C for 90 min. The ³²P-labeled RNA was extracted with phenol/chloroform and chloroform treatment, and precipitated with ethanol. The extracted RNA was separated on an 8% polyacrylamide gel containing 7 M urea and TBE. Radioactivity was detected and measured using BAS-2000 II.

Protoplast transient expression assay with GFP fusion proteins

The *NcoI*-ArTFIIIA cDNA was PCR amplified using the primers (5'-ATTCTATGAATCTTGGTGTGTTG-3') and (5'-ATTCTATGAATCTTACTCTTCATCG-3') and inserted at the *NcoI* restriction site of the GFP fusion vector pAVA393 (32) containing a cytosolic derivative of the GFP5 cDNA (33) driven by the constitutive 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter. In the resulting construct, ArTFIIIA is fused to the N-terminal region of the GFP5. Similarly, the ArL5 cDNA was amplified by PCR using the primers (5'-ATTCTATCCATGGTGTGTTGTAAG-3') and (5'-AAT-CTATCCATGGACTCTTCATCG-3') including *NcoI* restriction sites, and cloned into pAVA393. The resulting constructs, named pAVA-ArTFIIIA and pAVA-ArL5, respectively, were verified by sequencing.

Protoplasts were prepared from *Arabidopsis* cultured cells and transformed as described (34) with minor modifications (C.I.White, unpublished). Transformations were performed with 50 µg of plasmids (pAVA393, pAVA-ArTFIIIA or pAVA-ArL5) purified using the Plasmid midiprep Kit (Qiagen). Protoplasts were observed 30 h after transformation using a ZEISS Axioplan 2 microscope.

RESULTS

Amplification and cloning of the putative *Arabidopsis* TFIIIA and L5 cDNAs

Searching Cys₂-His₂-type multi-zinc finger proteins in the *Arabidopsis* database resulted in the identification of only one predicted protein containing nine zinc fingers (accession no. AAG51140). As the presence of nine zinc fingers is the only common feature between TFIIIA proteins characterized to date, we considered this protein to be a likely candidate to be *Arabidopsis* TFIIIA (named ArTFIIIA). The open reading frame encoding this protein (accession no. AC069273) is carried by the BAC clone F28P5 mapped on chromosome 1. A cDNA encoding the putative ArTFIIIA protein was amplified by PCR from a cDNA library using primers designed according to the sequence of the predicted cDNA. The sequence of the obtained cDNA (accession no. AY186610) revealed that the predicted second exon was 66 bp too long in its 3' end. Furthermore, predicted exons 5 and 6 were 20 and 43 bp too short in their 3' and 5' end, respectively. The remainder of the coding sequence was identical to the database prediction.

The 412 amino acid encoded protein contains nine Cys₂-His₂-type zinc fingers as well as 19 amino acid N-terminal and 50 amino acid C-terminal non-zinc finger tails. The nine zinc finger sequences comply with the F/I-X-C-X₍₂₋₄₎-C-X₃-F-X₁-K-X₍₂₋₃₎-L-X₂-H-X₍₃₋₅₎-H consensus. Sequence similarity between ArTFIIIA and any other known TFIIIA is dominated by the seven residues found in each zinc finger that are required for proper folding of the protein. These include three

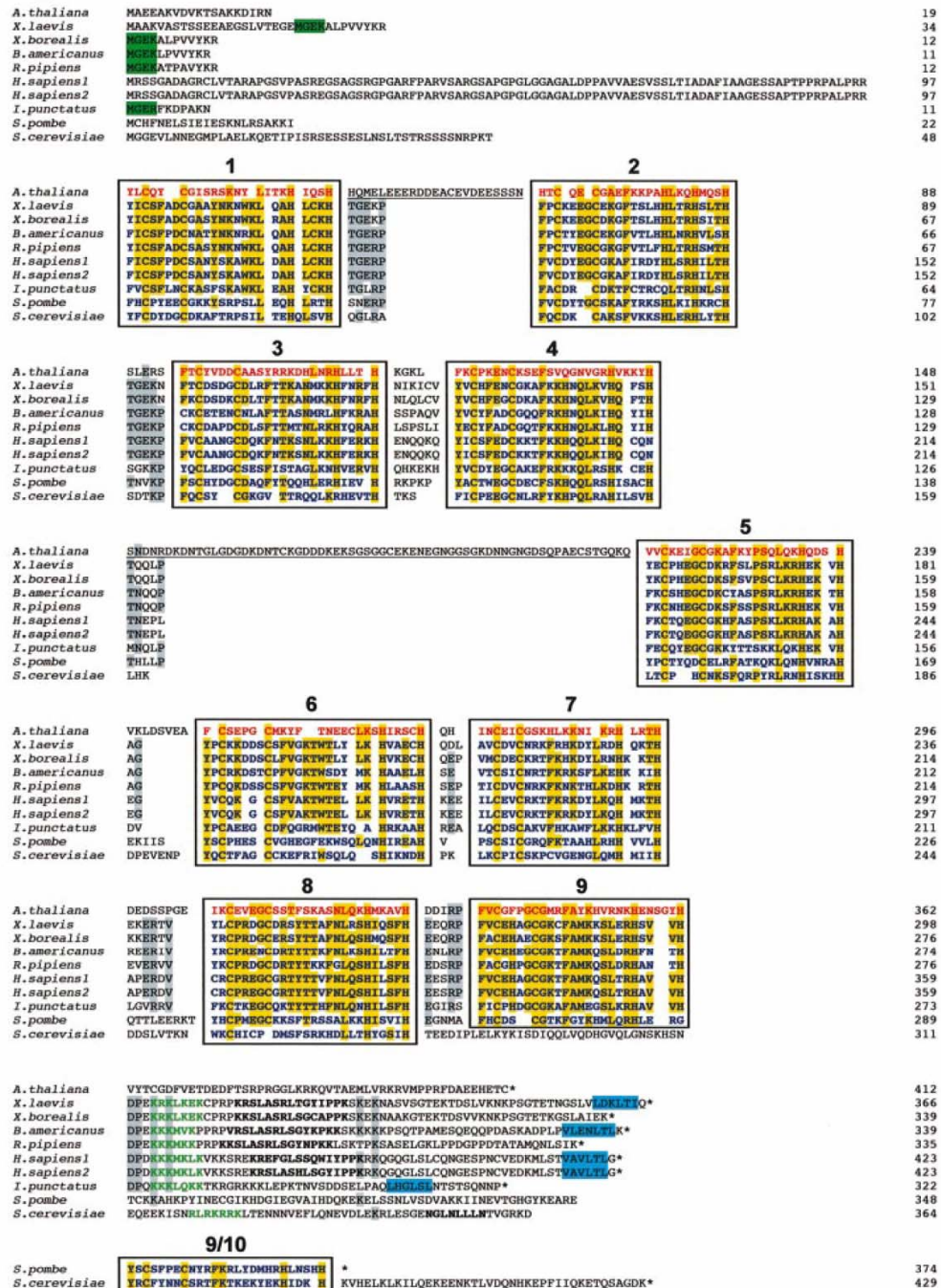


Figure 1. Primary sequence alignment of known TFIIAs with *Arabidopsis* TFIIA. Sequences were aligned manually to match each of the nine zinc fingers of *At*TFIIA with the corresponding finger of the other TFIIAs. Zinc fingers are framed and numbered. Note that the ninth finger from *S. cerevisiae* was aligned with finger 10 from *S. pombe* only for illustration. Non-aligned regions between fingers 1 and 2, and 4 and 5 in the *At*TFIIA sequence are underlined. *At*TFIIA zinc fingers are in red, and zinc fingers of other organisms are shown in blue. Conserved residues (in >50% of the sequences) in the zinc fingers or in non-finger regions are highlighted in yellow or gray, respectively. The oocyte motif MGEG/R and the NES motifs are highlighted in green and blue, respectively. NLS motifs are written in green characters, and TAS motifs are indicated in black bold type. Asterisk marks the end of the sequence. The residue number is shown to the right of each line of sequence.

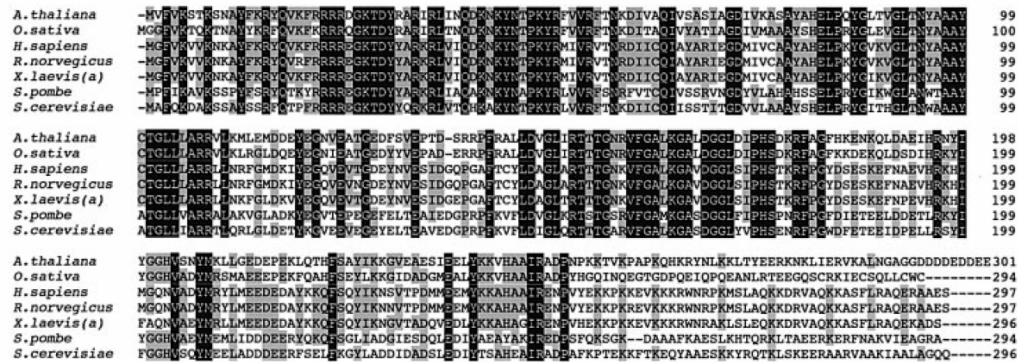


Figure 2. Primary sequence alignment of AtL5 with some known L5s. Sequences were aligned using the CLUSTALW program. Identical residues (in 100% of the sequences) are highlighted in black, and conserved residues (in >50% of the sequences) are highlighted in gray. The residue number is shown to the right of each line of sequence.

hydrophobic residues: F or I in *Arabidopsis* (but F or Y in other species), F, L and two Zn²⁺-coordinating cysteines and histidines. Excluding these conserved residues, the overall identity of AtTFIIIA to known TFIIIAs is low. For instance, there is only 26% sequence identity between *A. thaliana* and *X. laevis*, and 17% sequence identity between *A. thaliana* and *S. cerevisiae*. Alignment of TFIIIA sequences reveals that AtTFIIIA is organized differently from its homologs (Fig. 1). AtTFIIIA contains two unique 23 and 66 amino acid spacers located between zinc fingers 1 and 2, and 4 and 5, respectively. Amongst known TFIIIAs, such a long spacer sequence (81 amino acids) exists between fingers 8 and 9 in *S. cerevisiae* TFIIIA. The *S. pombe* TFIIIA carries a unique tenth zinc finger which has no equivalent in other organisms. Several sequence motifs have been defined in the different TFIIIA sequences, but none of them could be found either in the N- and C-terminus tails, or in the spacers of the AtTFIIIA protein sequence. We searched for the N-terminal MGEK motif characteristic of the smaller oocyte form of *X. laevis* TFIIIA (3–5,35), the nuclear localization signal (NLS) (7,8), the transcription-activating signal (TAS) (7,11,36) and the nuclear export signal (NES) (7,37) found in some of the reported TFIIIA sequences (Fig. 1), but could not identify any of them in the terminal tails nor in the spacer sequences of AtTFIIIA.

The cDNA encoding the putative *Arabidopsis* 5S rRNA-binding ribosomal protein L5 (AtL5) was PCR amplified from the cDNA library, using primers designed according to the sequence of the cDNA present in the database. Unlike AtTFIIIA, the primary sequence of the putative AtL5 protein revealed a high degree of conservation (~54% identity between *Arabidopsis* and human, see Fig. 2).

Sequence-specific DNA-binding activity

To investigate the biochemical properties of the putative AtTFIIIA and AtL5 proteins, the cloned cDNAs were used for expression of the proteins in the *E. coli* BLR(DE3) strain. Two recombinant GST fusion proteins (GST–AtTFIIIA and GST–AtL5) were purified (Fig. 3A and D).

One property of TFIIIA is to bind specifically to the 5S rRNA gene. Gel retardation assays demonstrate that the

recombinant protein indeed possesses 5S rDNA-binding activity, although the GST protein alone does not (Fig. 3B, C and F). Competition experiments revealed that the DNA-binding activity of the AtTFIIIA recombinant protein is 5S sequence specific (Fig. 3B and C). As expected, GST–AtL5 protein does not bind to the 5S rRNA gene (Fig. 3E). The equilibrium binding constant (K_d) for the interaction between AtTFIIIA and 5S rDNA, reflecting the affinity of AtTFIIIA for the 5S rRNA gene, was determined using a gel mobility shift assay as described previously (10). We measured a K_d of 0.33 nM (SE ± 0.05) for the interaction between AtTFIIIA and 5S rDNA. This value is comparable with those reported previously for other known TFIIIA (10,38,39).

DNase I footprinting

To analyze further the binding of AtTFIIIA to the 5S rRNA gene, DNase I footprinting was performed on both the template and the RNA-like strands (Fig. 4), using recombinant GST–AtTFIIIA and GST as a control. The protection pattern of the AtTFIIIA protein extends from position +43 to +97 on the template strand and from +45 to +103 on the RNA-like strand. Unprotected regions are found from +63 to +76 on the template strand and from +71 to +76 on the RNA-like strand. This protection pattern is similar to those observed for *X. laevis* [+47 to +96; (40)], and recently reported for *A. castellanii* [+44 to +97; (12)] and *S. pombe* [+45 to +95; (10)]. However, we did not observe any DNase I-hypersensitive site around position +63 as described for these known TFIIIA proteins (10,12,40). As expected, GST alone does not produce any protection along the 5S gene.

5S rRNA-binding activity of putative AtTFIIIA and AtL5

Another characteristic of TFIIIA is to bind not only to the 5S rRNA gene, but also to 5S rRNA, the gene product. Similarly, the L5 ribosomal protein can bind to 5S rRNA, forming the 5S RNP. To investigate this common property between TFIIIA and L5 on the putative AtTFIIIA and AtL5 proteins, we performed gel retardation assays using an *in vitro* transcribed 5S rRNA. Incubation of increasing concentrations of

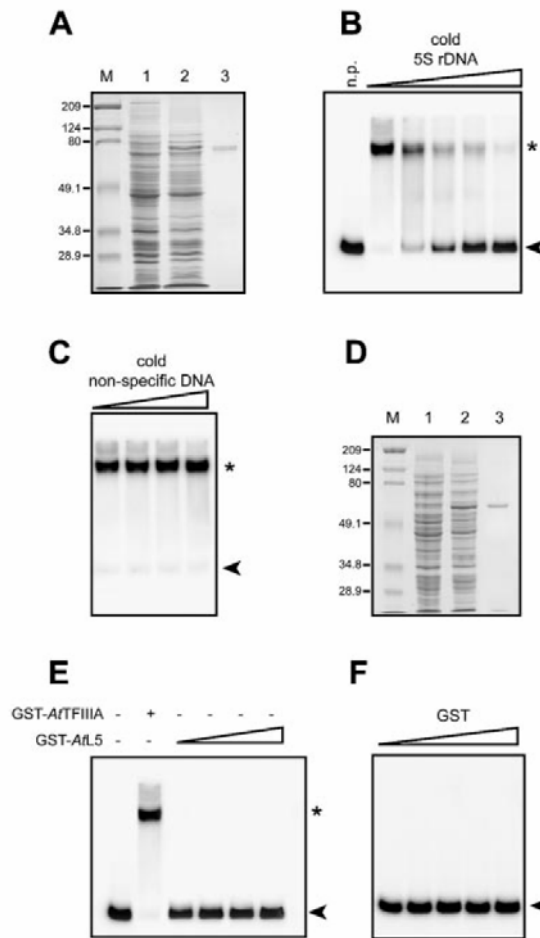


Figure 3. DNA binding assays of GST-ArTFIIIA and GST-ArL5 recombinant proteins. (A and D) SDS-PAGE of GST-ArTFIIIA and GST-ArL5 recombinant proteins, respectively. Shown are results for uninduced *E. coli* BLR (DE3) (lane 1), IPTG-induced cells (lane 2) and purified recombinant proteins (lane 3). Proteins were visualized by staining with Coomassie brilliant blue. The sizes (in kDa) of molecular mass markers run in lane M are indicated on the left. Increasing concentrations (1–170 nM) of unlabeled 5S rDNA (B) or non-specific competitor DNA (C) were added to binding reactions including labeled 5S rDNA and GST-ArTFIIIA (2.5 ng/μl). Binding reactions were performed with increasing concentrations (2.5–10 ng/μl) of either ArL5 (E) or GST alone (F). Arrowheads indicate free (unbound) probe, and protein-DNA complexes are indicated by an asterisk. n.p., no protein.

GST-ArTFIIIA or GST-ArL5 protein with 5S rRNA resulted in the appearance of a 5S rRNA-protein complex with slower mobility in non-denaturing gel electrophoresis (Fig. 5A and B). Control experiments showed that GST alone does not bind to 5S rRNA (Fig. 5D) and that neither GST-ArL5 nor GST-ArTFIIIA bind to a non-specific RNA (Fig. 5C).

Taken together, these results demonstrate that the putative ArTFIIIA protein indeed possesses a 5S rRNA-binding activity and that ArL5 is the actual *Arabidopsis* homolog of the ribosomal L5 protein.

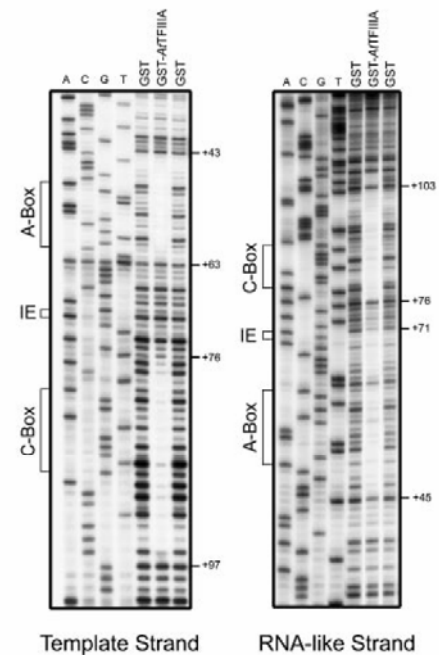


Figure 4. DNase I footprint of ArTFIIIA. DNase I cleavage of each strand is presented. Numbers to the right of each gel indicate the position of DNase I cleavage relative to the start site of transcription (+1). The positions of the A-box, the intermediate element (IE) and the C-box are shown to the left of each gel.

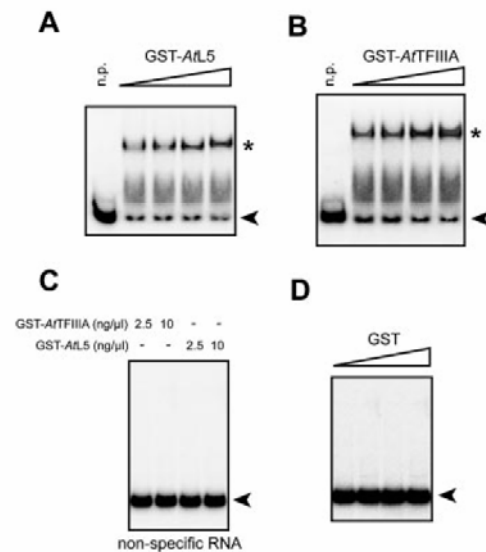


Figure 5. 5S rRNA binding analysis of GST-ArTFIIIA and GST-ArL5 proteins. A constant amount of labeled 5S rRNA probe synthesized *in vitro* was incubated with increasing concentrations (2.5–10 ng/μl) of GST-ArL5 (A), GST-ArTFIIIA (B) or GST (D) proteins and then subjected to gel mobility shift analysis. As a control, GST-ArTFIIIA and GST-ArL5 proteins were incubated with non-specific RNA (C). Arrowheads indicate free (unbound) probe, and protein-RNA complexes are indicated by an asterisk. n.p., no protein.

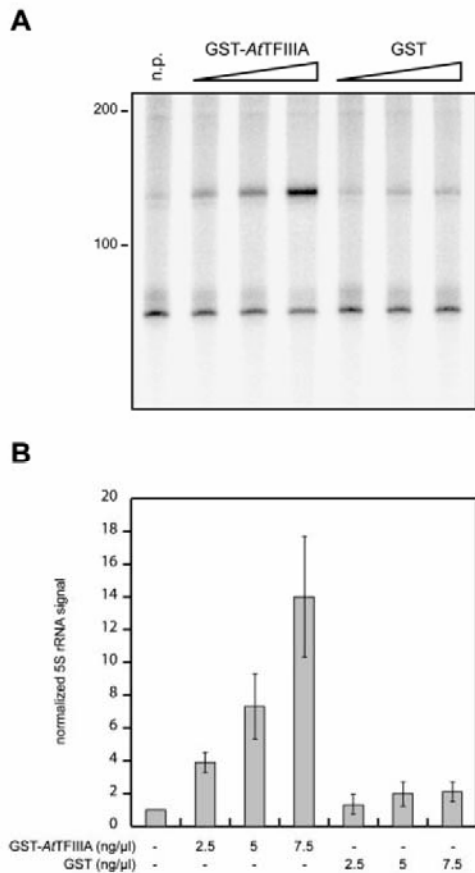


Figure 6. *In vitro* transcription assays. (A) Reactions were performed without added recombinant protein (n.p.) or with increasing concentrations (2.5–7.5 ng/μl) of GST–ArTFIIIA or GST. (B) Quantification and graphical representation of the data from several independent experiments similar to that shown in (A). The asterisk and arrowhead indicate endogenous tRNA and 5S rRNA, respectively. Molecular sizes are indicated (in nucleotides) next to the gel.

Transcriptional activity of the putative ArTFIIIA protein

To test the ability of putative ArTFIIIA to support transcription of the *Arabidopsis* 5S rRNA gene, we used an *in vitro* transcription system from tobacco cells (41,42). This system can transcribe an *Arabidopsis* 5S rRNA gene without added recombinant ArTFIIIA (Fig. 6A, first lane) (31). Transcription of the 5S rRNA gene was dramatically stimulated by the addition of recombinant GST–ArTFIIIA, while not significantly modified by the addition of GST alone (Fig. 6A). Addition of GST–ArTFIIIA did not stimulate the transcription of a tRNA gene (data not shown). The 5S rRNA signal normalized to the endogenous tRNA signal was quantified and shows a 14-fold increase upon addition of 7.5 ng/μl of GST–ArTFIIIA (Fig. 6B).

Taken together with 5S rDNA- and 5S rRNA-binding activities, the ability of putative ArTFIIIA to stimulate 5S

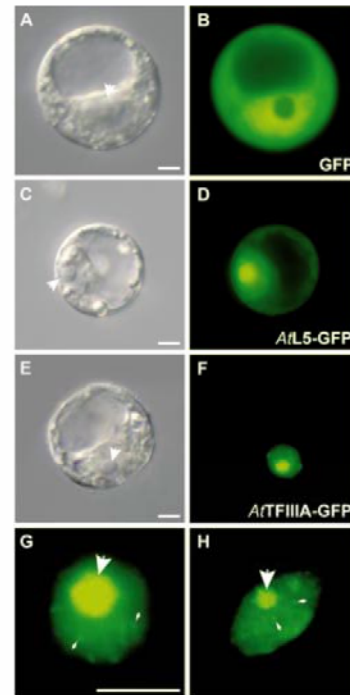


Figure 7. Cellular localization of ArTFIIIA and AtL5 proteins. Protoplasts were transformed with constructs expressing the proteins indicated and were observed 30 h post-transfection (B, D and F). Corresponding differential interference contrast (DIC) images are shown in (A), (C) and (E), respectively. White arrowheads indicate the nucleolus. (G and H) Close-up views of two protoplasts nuclei expressing the GFP–ArTFIIIA fusion protein. Small arrowheads indicate some of the bright nuclear foci present in addition to the nucleolus (large arrowhead). Scale bar (A–H) 10 μm.

rRNA gene transcription efficiently *in vitro* clearly demonstrates that the protein we have characterized is indeed *A.thaliana* TFIIIA.

Cellular localization of ArTFIIIA and AtL5 proteins

To investigate the cellular localization of the ArTFIIIA and AtL5 proteins, translational fusions of ArTFIIIA and AtL5 with an enhanced version of GFP (mGFP5) were made. Each construct was then transiently transfected to *Arabidopsis* cells protoplasts and monitored for GFP expression 30 h post-transfection.

As previously reported (43,44), and expected due to its small size, expression of GFP alone resulted in cytoplasmic and nuclear signals, the nucleolus being clearly devoid of signal (Fig. 7A and B). AtL5–GFP protein accumulates in the nucleus with significant nucleolar enrichment. A faint signal was observed in the cytoplasm, indicating that the protein is also present in this cellular compartment (Fig. 7C and D). This result is in good agreement with previous observations in somatic mammalian cells (21).

In contrast, expression of the ArTFIIIA–GFP protein resulted in complete absence of fluorescence in the cytoplasm (Fig. 7E and F), suggesting the presence of a functional NLS

in AtTFIIIA although not identified by sequence comparison (see Fig. 1). The nuclear localization of AtTFIIIA was heterogeneous, with a higher accumulation of the fusion protein in the nucleolus together with additional foci (Fig. 7F–H). As for AtL5, we conclude that AtTFIIIA is imported efficiently from the nucleoplasm to the nucleolus.

DISCUSSION

We report here the first cloning and characterization of TFIIIA from a higher plant, *A.thaliana*. We have shown that the protein has a specific 5S rDNA-binding activity together with a 5S rRNA-binding property as previously reported for *X.laevis* and *A.castellanii* TFIIAs (12,45). Moreover, AtTFIIIA can stimulate the transcription of an *Arabidopsis* 5S rRNA gene efficiently *in vitro*.

In the *Arabidopsis* database, only predicted TFIIIA cDNA was present. AtTFIIIA cDNA escaped sequencing programs probably because of the low content of AtTFIIIA in somatic cells. Indeed, TFIIIA was first purified from *X.laevis* oocytes which were shown to contain up to 10^{12} molecules per cell (3). For comparison, somatic *A.castellanii* and HeLa cells were estimated to contain only 170 and 400 molecules of TFIIIA, respectively (12,46). Rat TFIIIA was purified from breast tumor, and tumoral cells are known to contain enhanced pol III transcription [for a review see Brown *et al.* (47)]. The reason for our success in the amplification of AtTFIIIA cDNA could lie in the fact that we used a cDNA library from metabolically active *Arabidopsis* cells.

AtTFIIIA bears nine Cys₂-His₂-type zinc fingers including the conserved residues required for proper folding and specific 5S rDNA binding. Irregular spacing between these residues in the zinc fingers, C-X_(2–4)-C-X_(11–12)-H-X_(3–5)-H, may play a role in the alignment of AtTFIIIA zinc fingers along the 5S rRNA gene. The overall sequence identity between AtTFIIIA and yeast or vertebrate homologs ranges between 17 and 26%. Thus the divergence is too important to detect any convincing pattern of higher similarity between *Arabidopsis* and mammals, amphibians or yeasts. Apart from zinc fingers, known TFIIAs contain several sequence motifs. In the non-finger N-terminal region, the mammalian, yeast and *Arabidopsis* TFIIAs lack the conserved MGEK/R motif characteristic of the smaller oocyte form of TFIIIA from amphibians, also found in catfish TFIIIA purified from immature ovarian tissue (7). We assume that *Arabidopsis* does not synthesize an oocyte form of TFIIIA as already proposed for mammals (8). Vertebrate TFIIAs contain a variable length (49–68 amino acids) non-zinc finger region at the C-terminus, which contains a TAS, approximately 25 amino acids long, in amphibians (5,11) and mammals (8). In *S.cerevisiae*, the 81 amino acid spacer located between fingers 8 and 9 exhibits a leucine-rich oligopeptide required for transcription (48), which differs in sequence from the amphibian or mammalian TAS motifs. In *Arabidopsis*, the TAS domain could lie in the 66 amino acid spacer between fingers 4 and 5 or, alternatively, in the 50 amino acid long C-terminal tail. We could not find the NLS consensus sequence (KKKM/LKXX) present in the C-terminal region of vertebrates TFIIAs (8) nor the RLRKRRK NLS found in *S.cerevisiae* (48). Nonetheless, AtTFIIIA-GFP fusion experiments have clearly revealed a nuclear accumulation and an absence of the protein in the

cytoplasm of *Arabidopsis* protoplasts, indicating the presence of a functional NLS in AtTFIIIA which remains to be identified. Finally, a NES (LXXLTI) has been identified and functionally tested in amphibians (37). A similar motif, based on sequence comparison, has been described in catfish (LXXLSL) (7) and humans (VAVLTL) (8). No similar sequence motif could be found in AtTFIIIA primary sequence and, accordingly, AtTFIIIA-GFP fusion protein does not localize in the cytoplasm of transformed protoplasts.

The nuclear export of 5S rRNA by TFIIIA for subsequent accumulation at distinct cytoplasmic storage sites has only been reported in *Xenopus* oocytes (16,22). Pre-vitellogenic oocytes store 5S rRNA in the cytoplasm as either 7S (5S rRNA-TFIIIA complex) or 42S RNPs. In the 42S RNP particle, the p43 protein binds to the 5S rRNA (23,24). Mature oocytes represent a particular cell type where TFIIIA accumulates to 10^{12} molecules per cell. TFIIIA or L5 protein binds to 5S rRNA, and each of these two RNPs migrates out of the nucleus and accumulates in the cytoplasm, prior to development. Cytoplasmic storage sites for 5S rRNA have not been observed in somatic mammalian cells (19). This cytoplasmic phase of the 5S RNA biosynthetic pathway is probably unique to oocytes and does not occur in somatic cells (18).

We show here that the *Arabidopsis* ribosomal protein L5 binds to the 5S rRNA and accumulates in the nucleolus. Immediately after transcription, 5S RNA is transiently associated with the La protein which, amongst other things, functions in transcription termination of pol III transcripts (49,50). After association with La, 5S RNA is bound by ribosomal protein L5 to form a 5S rRNP particle. Then the 5S RNP migrates to the nucleolus to participate in large ribosomal subunit assembly. L5 accumulates in the nucleolus at a concentration which greatly exceeds that of assembling ribosomal subunits (18). Rosorius *et al.* (19) have shown that the binding of L5 protein to 5S rRNA correlates with its ability to accumulate in the nucleolus, as previously demonstrated for the nucleolin protein (51). After nucleolar localization, the 5S RNP becomes incorporated into large ribosomal subunits and is then exported from the nucleus to the cytoplasm. In *Arabidopsis* protoplasts, the AtL5-GFP fusion protein localizes predominantly to the nucleolus and to a lesser extent to the nucleoplasm, and exhibits a faint homogenous staining pattern in the cytoplasm which probably reveals the protein incorporated into ribosomes. This pattern is in good agreement with previous observations made in monkey and human cells using an anti-5S RNP antibody (21).

In *Arabidopsis* protoplasts, the AtTFIIIA-GFP fusion protein was concentrated in the nucleolus and at several nuclear foci. Since 5S rDNA transcription occurs in the nucleoplasm and AtTFIIIA specifically binds to 5S rDNA, these nuclear foci could correspond to the transcribed 5S rDNA loci. In the germinal vesicle of *Xenopus* oocytes, it was reported previously, using polyclonal antibodies, that TFIIIA localizes in nuclear organelles, called Cajal bodies, which were assumed to be the primary site for assembly of the transcription machinery of the nucleus (52,53). Hence, we hypothesize that the fluorescent foci observed along with the nucleolus could also correspond to Cajal bodies where AtTFIIIA would accumulate and be incorporated in the pol III transcription machinery before delivery to the

chromosomal sites of 5S rDNA transcription. In germinal vesicle of *Xenopus* oocytes, TFIIIA was only detected in Cajal bodies but not in nucleoli (52,53). To our knowledge, our results describe for the first time the localization of TFIIIA in somatic cells and its presence in the nucleolus. The reason for the nucleolar accumulation of A/TFIIIA remains unclear because nucleoplasm–nucleolus shuttling of 5S rRNA is known to be mediated by L5. However, as A/TFIIIA binds 5S rRNA, this nucleoplasm–nucleolus trafficking could occur as 7S RNP.

A model in which a network of nucleic acid–protein interactions, involving TFIIIA, L5, 5S rRNA and 5S rDNA, regulates 5S rRNA synthesis has been proposed (13). In this model, formation of 7S RNP regulates 5S rRNA synthesis because it lowers the amount of free TFIIIA available for 5S rDNA transcription. In *Xenopus* oocytes, 7S RNPs are sequestered in the cytoplasmic compartment. In the light of our results, we formulate the hypothesis that in somatic cells, 7S RNPs are stored in the nucleolus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank A. G. von Arnim for providing GFP fusion plasmids, J. Y. Bleuyard for helpful advice with protoplasts transformation, C. Cuvillier for technical assistance, Dr J. Obokata for helpful discussions, and C. Bousquet-Antonelli for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS and by the Université Blaise Pascal. O.M. is the recipient of a fellowship from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

REFERENCES

- Bieker, J.J., Martin, P.L. and Roeder, R.G. (1985) Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription. *Cell*, **40**, 119–127.
- Setzer, D.R. and Brown, D.D. (1985) Formation and stability of the 5 S RNA transcription complex. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2483–2492.
- Ginsberg, A.M., King, B.O. and Roeder, R.G. (1984) *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell*, **39**, 479–489.
- Gaskins, C.J. and Hanas, J.S. (1990) Sequence variation in transcription factor IIIA. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2117–2123.
- Gaskins, C.J., Smith, J.F., Ogilvie, M.K. and Hanas, J.S. (1992) Comparison of the sequence and structure of transcription factor IIIA from *Bufo americanus* and *Rana pipiens*. *Gene*, **120**, 197–206.
- Drew, P.D., Nagle, J.W., Canning, R.D., Ozato, K., Biddison, W.E. and Becker, K.G. (1995) Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to *Xenopus* TFIIIA. *Gene*, **159**, 215–218.
- Ogilvie, M.K. and Hanas, J.S. (1997) Molecular biology of vertebrate transcription factor IIIA: cloning and characterization of TFIIIA from channel catfish oocytes. *Gene*, **203**, 103–112.
- Hanas, J.S., Hocker, J.R., Cheng, Y.G., Lerner, M.R., Brackett, D.J., Lightfoot, S.A., Hanas, R.J., Madhusudhan, K.T. and Moreland, R.J. (2002) cDNA cloning, DNA binding and evolution of mammalian transcription factor IIIA. *Gene*, **282**, 43–52.
- Archambault, J., Milne, C.A., Schappert, K.T., Baum, B., Friesen, J.D. and Segall, J. (1992) The deduced sequence of the transcription factor TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* reveals extensive divergence from *Xenopus* TFIIIA. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3282–3288.
- Schulman, D.B. and Setzer, D.R. (2002) Identification and characterization of transcription factor IIIA from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2772–2781.
- Mao, X. and Darby, M.K. (1993) A position-dependent transcription-activating domain in TFIIIA. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7496–7506.
- Polakowski, N. and Paule, M.R. (2002) Purification and characterization of transcription factor IIIA from *Acanthamoeba castellanii*. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1977–1984.
- Pittman, R.H., Andrews, M.T. and Setzer, D.R. (1999) A feedback loop coupling 5S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33198–33201.
- Wyszko, E. and Barciszewska, M. (1997) Purification and characterization of transcription factor IIIA from higher plants. *Eur. J. Biochem.*, **249**, 107–112.
- Wyszko, E., Radlowski, M., Bartkowiak, S. and Barciszewska, M.Z. (1997) Maize TF IIIA—the first transcription factor IIIA from monocotyledons. Purification and properties. *Acta Biochim. Pol.*, **44**, 579–589.
- Guddat, U., Bakken, A.H. and Pieler, T. (1990) Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* oocytes. *Cell*, **60**, 619–628.
- Deshmukh, M., Tsay, Y.F., Paulovich, A.G. and Woolford, J.L., Jr (1993) Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2835–2845.
- Michael, W.M. and Dreyfuss, G. (1996) Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5S rRNA binding and nucleolar localization. *J. Biol. Chem.*, **271**, 11571–11574.
- Rosorius, O., Fries, B., Stauber, R.H., Hirschmann, N., Bevec, D. and Hauber, J. (2000) Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12061–12068.
- Pieler, T. and Rudt, F. (1997) Nucleocytoplasmic transport of 5S ribosomal RNA. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **8**, 79–82.
- Steitz, J.A., Berg, C., Hendrick, J.P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J. and Yario, T. (1988) A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, **106**, 545–556.
- Allison, L.A., North, M.T. and Neville, L.A. (1995) Differential binding of oocyte-type and somatic-type 5S rRNA to TFIIIA and ribosomal protein L5 in *Xenopus* oocytes: specialization for storage versus mobilization. *Dev. Biol.*, **168**, 284–295.
- Picard, B., le Maire, M., Wegnez, M. and Denis, H. (1980) Biochemical research on oogenesis. Composition of the 42-S storage particles of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Biochem.*, **109**, 359–368.
- Joho, K.E., Darby, M.K., Crawford, E.T. and Brown, D.D. (1990) A finger protein structurally similar to TFIIIA that binds exclusively to 5S RNA in *Xenopus*. *Cell*, **61**, 293–300.
- Dechampsme, A.M., Koroleva, O., Leger-Silvestre, I., Gas, N. and Camier, S. (1999) Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway. *J. Cell Biol.*, **145**, 1369–1380.
- Allison, L.A., North, M.T., Murdoch, K.J., Romaniuk, P.J., Deschamps, S. and le Maire, M. (1993) Structural requirements of 5S rRNA for nuclear transport, 7S ribonucleoprotein particle assembly and 60S ribosomal subunit assembly in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6819–6831.
- Rudt, F. and Pieler, T. (1996) Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J.*, **15**, 1383–1391.
- Murdoch, K.J. and Allison, L.A. (1996) A role for ribosomal protein L5 in the nuclear import of 5S rRNA in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.*, **227**, 332–343.
- DeVeylder, L., de Almeida Engler, J., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G. and Inze, D. (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta*, **208**, 453–462.
- Moffatt, B.A., McWhinnie, E.A., Agarwal, S.K. and Schaff, D.A. (1994) The adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **143**, 211–216.
- Mathieu, O., Yukawa, Y., Sugiura, M., Picard, G. and Tourmente, S. (2002) 5S rRNA genes expression is not inhibited by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **29**, 313–323.
- von Arnim, A.G., Deng, X.W. and Stacey, M.G. (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene*, **221**, 35–43.
- Siemerling, K.R., Golbik, R., Sever, R. and Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.*, **6**, 1653–1663.
- Mathur, J., Konec, C. and Szabados, L. (1995) A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Rep.*, **14**, 221–226.
- Kim, S.H., Darby, M.K., Joho, K.E. and Brown, D.D. (1990) The characterization of the TFIIIA synthesized in somatic cells of *Xenopus laevis*. *Genes Dev.*, **4**, 1602–1610.

36. Vrana, K.E., Churchill, M.E., Tullius, T.D. and Brown, D.D. (1988) Mapping functional regions of transcription factor TFIIIA. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1684–1696.
37. Fridell, R.A., Fischer, U., Luhrmann, R., Meyer, B.E., Meinkoth, J.L., Malim, M.H. and Cullen, B.R. (1996) Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 2936–2940.
38. Del Rio, S., Menezes, S.R. and Setzer, D.R. (1993) The function of individual zinc fingers in sequence-specific DNA recognition by transcription factor IIIA. *J. Mol. Biol.*, **233**, 567–579.
39. Rowland, O. and Segall, J. (1996) Interaction of wild-type and truncated forms of transcription factor IIIA from *Saccharomyces cerevisiae* with the 5S RNA gene. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12103–12110.
40. Engelke, D.R., Ng, S.Y., Shastry, B.S. and Roeder, R.G. (1980) Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell*, **19**, 717–728.
41. Fan, H. and Sugiura, M. (1995) A plant basal *in vitro* system supporting accurate transcription of both RNA polymerase II- and III-dependent genes: supplement of green leaf component(s) drives accurate transcription of a light-responsive rbcS gene. *EMBO J.*, **14**, 1024–1031.
42. Yukawa, Y., Sugita, M. and Sugiura, M. (1997) Efficient *in vitro* transcription of plant nuclear (rRNA(Ser) genes in a nuclear extract from tobacco cultured cells. *Plant J.*, **12**, 965–970.
43. Grebenok, R.J., Pierson, E., Lambert, G.M., Gong, F.C., Afonso, C.L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C. and Galbraith, D.W. (1997) Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J.*, **11**, 573–586.
44. Stauber, R., Gaitanaris, G.A. and Pavlakis, G.N. (1995) Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. *Virology*, **213**, 439–449.
45. Theunissen, O., Rudt, F., Guddat, U., Mentzel, H. and Pieler, T. (1992) RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA. *Cell*, **71**, 679–690.
46. Moorefield, B. and Roeder, R.G. (1994) Purification and characterization of human transcription factor IIIA. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20857–20865.
47. Brown, T.R., Scott, P.H., Stein, T., Winter, A.G. and White, R.J. (2000) RNA polymerase III transcription: its control by tumor suppressors and its deregulation by transforming agents. *Gene Expr.*, **9**, 15–28.
48. Rowland, O. and Segall, J. (1998) A hydrophobic segment within the 81-amino-acid domain of TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* is essential for its transcription factor activity. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 420–432.
49. Gottlieb, E. and Steitz, J.A. (1989) The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription *in vitro*. *EMBO J.*, **8**, 841–850.
50. Gottlieb, E. and Steitz, J.A. (1989) Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.*, **8**, 851–861.
51. Schmidt-Zachmann, M.S. and Nigg, E.A. (1993) Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J. Cell Sci.*, **105**, 799–806.
52. Gall, J.G., Bellini, M., Wu, Z. and Murphy, C. (1999) Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 4385–4402.
53. Murphy, C., Wang, Z., Roeder, R.G. and Gall, J.G. (2002) RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3466–3476.

Etude d'un produit d'épissage alternatif de TFIIIA : TFIIIAbis

Vaillant, I., Mathieu, O., Yukawa, Y., Pelczar, P. et Tourmente, S.

Introduction

Chez les eucaryotes supérieurs, de nombreux gènes contiennent des introns qui sont éliminés de l'ARNm précurseur (pré-ARNm) correspondant, produisant ainsi un ARNm mature et fonctionnel. Cependant, la machinerie d'épissage peut traiter un même pré-ARNm de différentes manières, et procéder à un assemblage différent des exons. Ainsi des protéines fonctionnelles différentes sont produites ; l'épissage alternatif participe donc à la diversité du protéome. Par exemple, chez l'Homme, des estimations indiquent qu'environ 40 % des gènes seraient épissés de façon alternative (Modrek and Lee, 2002). Parmi ces gènes, environ 75 % codent des protéines impliquées dans la signalisation et dans la régulation des gènes, comme des récepteurs et des facteurs de transcription (Modrek and Lee, 2002). De même chez *Arabidopsis*, la grande majorité des gènes épissés alternativement, codent des protéines impliquées dans des fonctions de régulation (Kazan, 2003). De plus, chez les plantes et les animaux, les gènes associés à différentes réponses au stress, semblent particulièrement enclins aux épissages alternatifs (Kazan, 2003). Récemment, Wang et Brendel ont estimé qu'environ 20 % des gènes exprimés chez *Arabidopsis* et chez le riz sont épissés alternativement (Wang and Brendel, 2006).

Lors de notre étude du facteur de transcription TFIIIA (article n°1 (Mathieu et al., 2003)), nous avons amplifié l'ADNc correspondant à TFIIIA, mais également un deuxième ADNc issu d'un épissage alternatif. Nous présentons ici les résultats obtenus lors de l'étude de ce deuxième ADNc.

Résultats

Amplification de TFIIIAbis

Lors de l'amplification de l'ADNc de TFIIIA (avec les primers TF3A1 et TF3A2 ; article n°1 (Mathieu et al., 2003)) à partir d'une banque d'ADNc de cellules d'*Arabidopsis* (De Veylder et al., 1999), un deuxième produit a été amplifié (figure 14A). Ce deuxième produit d'amplification a été cloné et séquencé. La séquence de cet ADNc indique qu'il correspond à l'épissage alternatif de TFIIIA dont le détail est schématisé dans la figure 14B. Cette forme épissée a été dénommée TFIIIAbis. L'existence de ces deux produits d'épissage était prédite dans les banques de données (numéros d'accès AT1G7250.2 pour TFIIIA, et AT1G72050.1 pour TFIIIAbis). Un exon alternatif est présent entre les exons 2 et 3 au

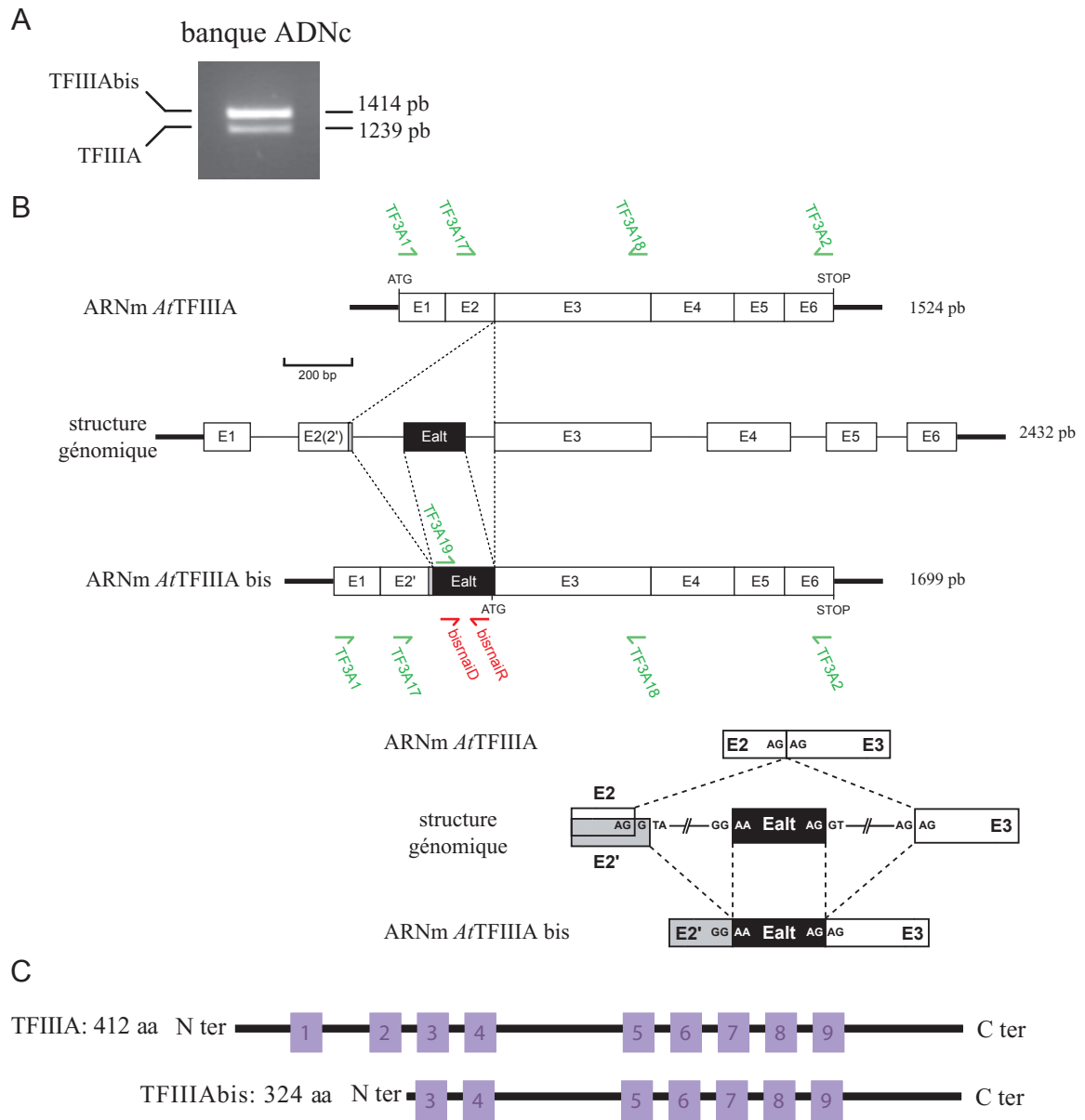


Figure 14: Epissage alternatif de TFIIIA.

(A) Amplification par PCR de TFIIIA et TFIIIAbis (avec les primers TF3A1 et TF3A2, voir (B)) à partir d'une banque d'ADNc de cellules *Arabidopsis thaliana*. (B) Schémas des épissages produisant l'ARNm *At*TFIIIA et l'ARNm *At*TFIIIAbis; les primers utilisés pour les différentes expériences sont représentés par les demi-flèches vertes et rouges. (C) Schématisation des protéines TFIIIA et TFIIIAbis; les carrés mauves représentent les doigts de zinc; N ter: extrémité N terminale; C ter: extrémité C terminale.

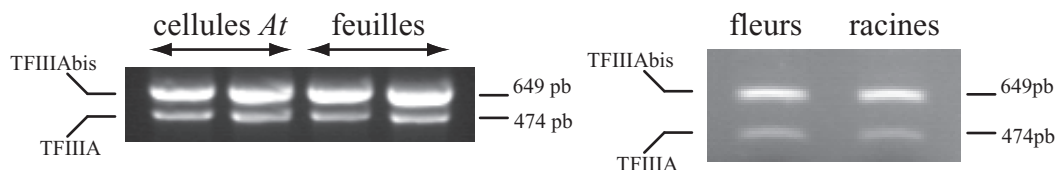


Figure 15: RT-PCR de TFIIIA et TFIIIAbis dans différents types cellulaires. Des ARN totaux de cellules *At* (*Arabidopsis thaliana*), de feuilles, de fleurs et de racines ont été reverse transcrits avec le primer TF3A2, puis amplifiés par PCR avec les primers TF3A17 et TF3A18 (voir figure 14B).

niveau de l'ARNm TFIIIAbis épissé alors qu'il est absent dans celui de TFIIIA. Un codon initiateur de traduction est présent à l'extrémité 3' de cet exon alternatif et la traduction *in silico* de cet ARNm TFIIIAbis prédit une protéine de 324 aas (figure 14C). Ainsi, la protéine putative TFIIIAbis porterait 7 doigts de zinc au lieu des 9 présents dans TFIIIA.

Nous avons alors procédé à des extractions d'ARN de différents tissus de plantules (feuilles, fleurs et racines) et de cellules d'*Arabidopsis thaliana* (cellules *At*) cultivées en suspension, pour préciser si la présence de l'ARNm TFIIIAbis est spécifique de certains tissus. Des expériences de RT-PCR sur ces ARN (voir matériels et méthodes) ont permis l'amplification de TFIIIA et de TFIIIAbis au niveau de tous les tissus testés (figure 15). L'ARNm de TFIIIAbis est donc présent dans différents tissus chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que dans des cellules *At* en culture. De plus, l'ARNm TFIIIAbis semble être toujours plus abondant que celui de TFIIIA dans toutes les conditions testées (figures 14A et 15).

TFIIIAbis lie l'ADNr 5S et les ARNr 5s

TFIIIA liant l'ADNr 5S et les ARNr 5S (article n°1(Mathieu et al., 2003)), nous avons testé si TFIIIAbis possède également ces propriétés biochimiques. Une protéine de fusion TFIIIAbis-GST a été produite (voir matériels et méthodes) et utilisée pour des expériences de retards sur gel. Ainsi, nous avons pu montrer que la protéine recombinante TFIIIAbis lie l'ADNr 5S contrairement à la GST seule (figure 16A). Des expériences de compétition soit avec de l'ADNr 5S non marqué, soit avec un ADN non spécifique, ont permis de montrer que cette liaison est spécifique (figure 16A).

Nous avons aussi procédé à des retards sur gel avec des ARNr 5S transcrits *in vitro*. Ces ARNr 5S incubés avec des quantités croissantes de TFIIIAbis-GST sont retardés, un « super retard » étant même présent avec les quantités les plus importantes de TFIIIAbis-GST (figure 16B). La protéine GST seule n'est pas capable de lier les ARNr 5S alors que des ARN non spécifiques ne sont pas retardés par TFIIIAbis-GST (figure 16B). Ces résultats permettent de conclure que TFIIIAbis lie les ARNr 5S de manière spécifique.

Ces différentes expériences montrent que, de façon similaire à TFIIIA, TFIIIAbis est capable de lier l'ADNr 5S et l'ARNr 5S.

Localisation cellulaire de TFIIIAbis

Nous avons montré dans l'article n°1 que la protéine TFIIIA d'*Arabidopsis thaliana* possède une localisation uniquement nucléaire, et en particulier qu'elle se concentre au niveau du nucléole et de foci additionnels. Afin d'étudier la localisation cellulaire de

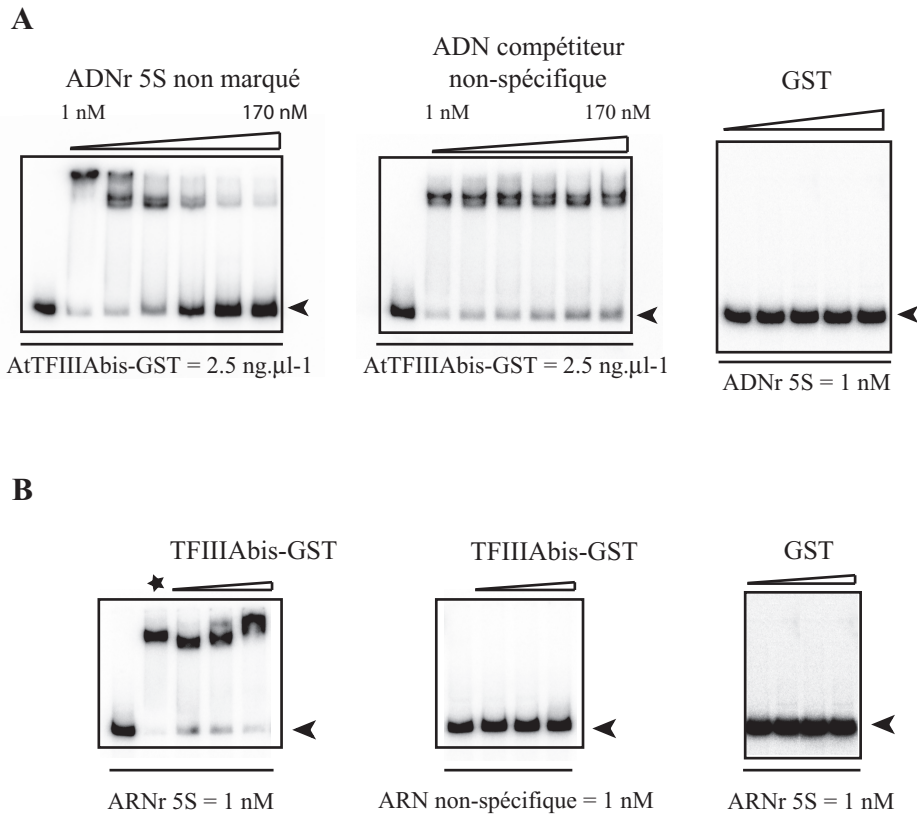


Figure 16: Expériences de retards sur gel de TFIIIAbis-GST. (A) Retard sur gel ADNr 5S; des concentrations croissantes (1-170 nM) d'ADNr 5S non marqué (gauche) ou d'ADN compétiteur non-spécifique (milieu) ont été ajoutées aux réactions de liaison; un retard sur gel avec des quantités croissantes (2.5-10 ng.µl-1) de GST seule est représenté à droite. (B) Retard sur gel ARNr 5S; Une quantité constante d'ARNr 5S marqué (à gauche) ou d'ARN non-spécifique (au milieu) a été incubée avec des quantités croissantes de TFIIIAbis-GST (2.5-10 ng.µl-1); l'étoile marque un témoin de retard avec 5 ng.µl-1 de TFIIIAbis-GST; un retard sur gel avec des quantités croissantes (2.5-10 ng.µl-1) de GST seule est représenté à droite. Les flèches noires indiquent les sondes (ADN ou ARN) non liées.

TFIIIAbis, des protoplastes ont été transformés avec une construction permettant l'expression d'une protéine de fusion GFP-TFIIIAbis. La protéine GFP non fusionnée est située dans le cytoplasme et dans le noyau (à l'exception du nucléole) alors que la protéine de fusion GFP-TFIIIAbis est localisée uniquement au niveau du noyau (figure 17). La petite taille de la protéine GFP permet à cette protéine une diffusion passive du cytoplasme au noyau. Tout comme TFIIIA, TFIIIAbis est concentrée au niveau du nucléole et de foci nucléaires additionnels (figure 17).

TFIIIAbis n'a pas d'activité transcriptionnelle *in vitro*

TFIIIAbis ayant la capacité de lier l'ADNr 5S, nous voulions savoir si, comme TFIIIA, cette protéine possède une fonction de facteur de transcription au niveau des gènes d'ARNr 5S. En collaboration avec Y. Yukawa (Nagoya, Japon), nous avons testé l'activité transcriptionnelle de TFIIIAbis au niveau d'un gène d'ARNr 5S dans un système de transcription *in vitro* de cellules de tabac. Une première expérience a été effectuée avec des extraits nucléaires de tabac permettant un taux basal (c'est-à-dire sans ajout de protéine recombinante) de transcription du gène d'ARNr 5S peu élevé (piste marquée d'une étoile figure 18A). Pour chaque expérience de transcription *in vitro*, les ARNt endogènes servent de contrôle de normalisation (figure 18). L'addition de quantités croissantes de TFIIIAbis-GST ou de GST n'a pas permis l'activation de la transcription du gène 5S, contrairement à TFIIIA-GST servant de contrôle positif (figure 18A). TFIIIAbis ne semble donc pas avoir d'effet positif sur cette transcription *in vitro*. La deuxième hypothèse que l'on peut formuler est que TFIIIAbis a un effet répresseur sur l'expression des gènes d'ARNr 5S. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé d'autres extraits nucléaires de tabac ayant une activité basale transcriptionnelle relativement forte sur un gène 5S (piste étoilée figure 18B). Aucune diminution de la transcription du gène 5S n'a été détectée par l'addition de quantités croissantes de TFIIIAbis-GST (figure 18B).

Ces résultats montrent donc qu'*in vitro*, TFIIIAbis n'a pas d'effet activateur ni répresseur sur la transcription d'un gène 5S. Cependant, on ne peut pas exclure que dans les extraits nucléaires de tabac ayant un taux basal de transcription élevé (utilisés pour tester une activité de répresseur), le gène d'ARNr 5S soit saturé en facteurs de transcription endogènes avant l'addition de protéines recombinantes, inhibant ainsi la liaison de la protéine recombinante TFIIIAbis-GST.

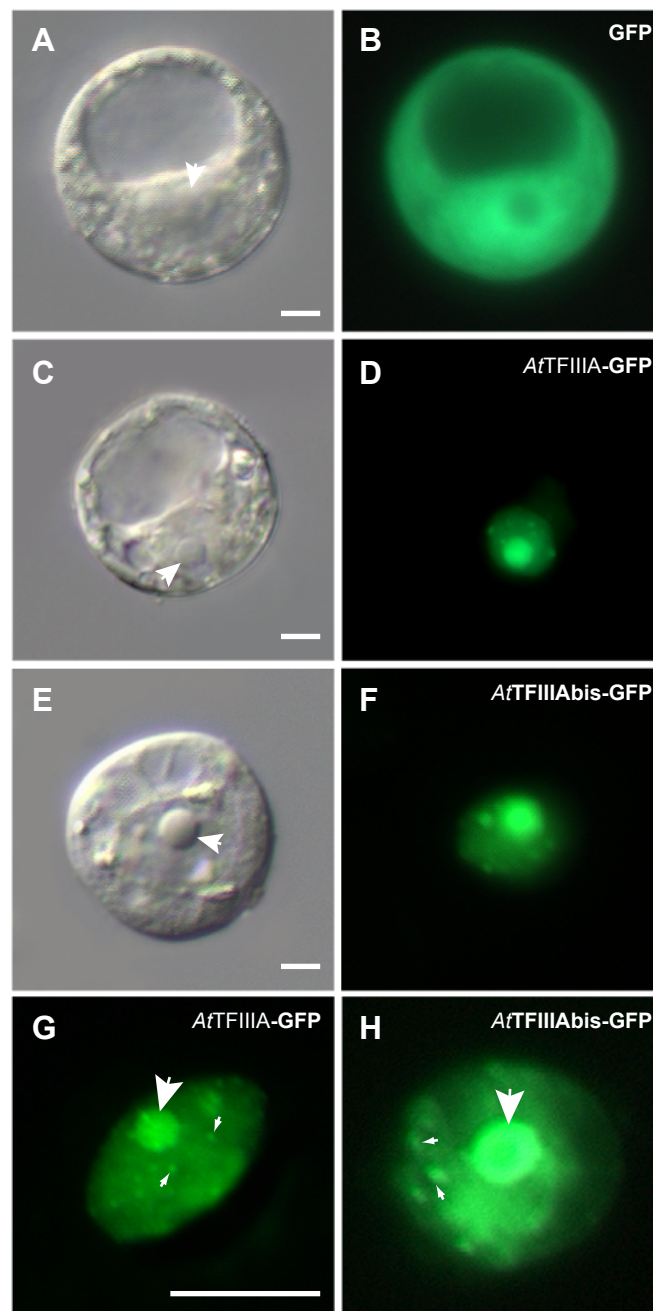


Figure 17: Localisation cellulaire de TFIIIAbis.

Des protoplastes ont été transformés avec des constructions exprimant les protéines indiquées, et observés 30h après transfection (B, D et F). (A), (C) et (E) indiquent les protoplastes correspondant en lumière visible. (G) et (H) sont des agrandissements de noyaux de protoplastes. Les larges flèches blanches indiquent le nucléole et les petites flèches blanches indiquent des foci supplémentaires. La barre d'échelle représente 10 μ m.

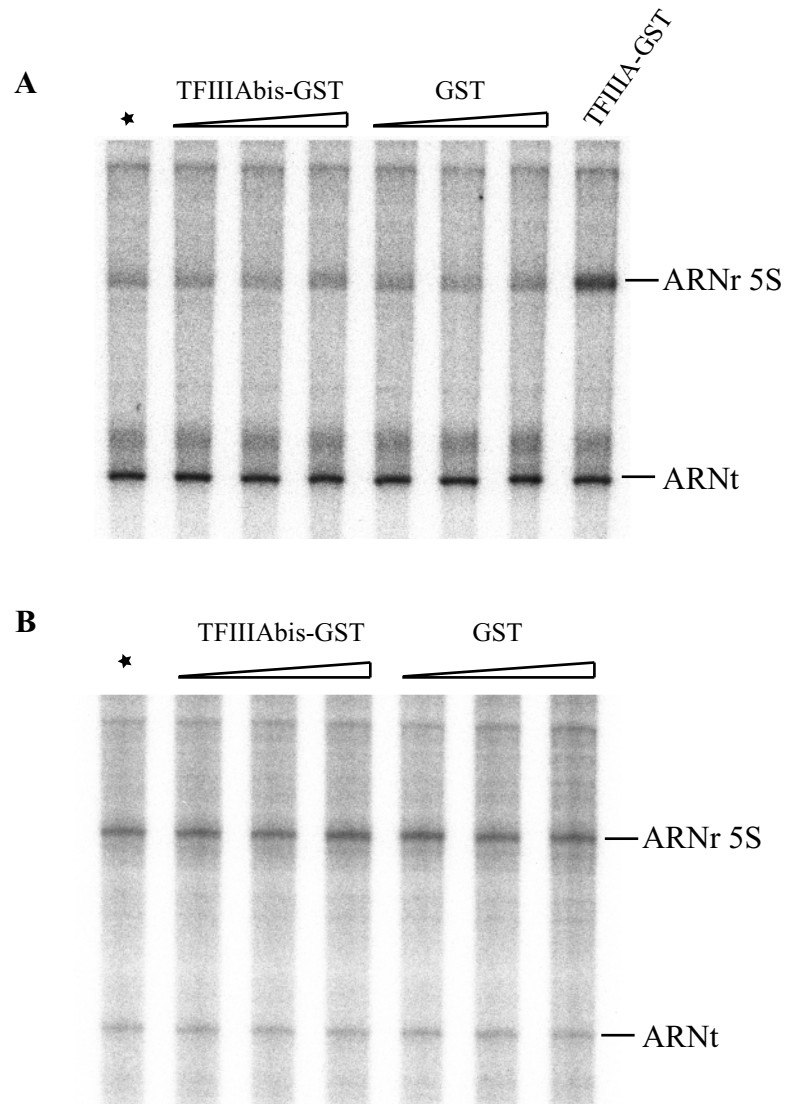


Figure 18: Transcription *in vitro*.

Différentes expériences de transcription *in vitro* ont été réalisées avec des concentrations croissantes de TFIIIAbis-GST ou de GST (2.5-7 ng.µl⁻¹). (A) Des extraits nucléaires de tabac, avec un taux basal de transcription 5S peu élevé, ont servi aux expériences de transcription *in vitro*. Un témoin de stimulation de la transcription *in vitro* de l'ADNr 5S a été réalisé avec TFIIIA-GST. (B) Des extraits nucléaires de tabac avec un taux basal de transcription 5S élevé ont servi aux expériences de transcription *in vitro*.

Les ARNr 5S et ARNt sont indiqués à droite des gels. L'étoile indique les transcriptions *in vitro* sans addition de protéine recombinante.

Utilisation de RNAi dirigé contre TFIIIAbis

Afin de savoir si TFIIIAbis a un effet sur l'expression des gènes d'ARNr 5S *in vivo*, nous avons utilisé une technique de RNAi dirigée contre TFIIIAbis. P. Pelczar (Zürich, Suisse) et J. Molinier (IBMP, Strasbourg) nous ont fourni le vecteur pOEXIII Pme (figure 19) qu'ils ont construit et déjà utilisé pour générer des plantes RNAi (données non publiées). Un fragment de 132 pb (appelé bisrnai D-R), correspondant à une partie de l'exon alternatif présent au niveau de l'ARNm de TFIIIAbis mais absent au niveau de l'ARNm de TFIIIA (voir matériel et méthodes, et figure 14B), a été cloné dans le vecteur pOEXIII Pme ; la construction résultante a été appelée bis-pOEXIII (figure 19). Des plantes *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia, ont été transformées soit avec la construction bis-pOEXIII, soit avec le vecteur pOEXIII Pme vide. Les plantes transformantes avec le vecteur vide nous ont servi de contrôle. Toutes les graines transformantes ont été sélectionnées sur sulfonamide et des extractions d'ADN ont été effectuées sur les plantes T1 ainsi sélectionnées. La vérification de l'intégration, de bisrnai D-R ou de la construction vide, dans le génome des plantes, a été effectuée par PCR (données non montrées).

Lors de la croissance simultanée des plantes contrôles T1 (construction vide) et des plantes T1 RNAi, différents phénotypes ont été remarqués. Ainsi, une quarantaine de plantes T1 RNAi possédaient un retard de croissance et certaines d'entre elles avaient un nombre accru de feuilles, ces dernières étant plus effilées que des feuilles de plantes contrôles (ou de plantes sauvages) (figure 19). Ces plantes ont été notées de 1 à 40. De plus, certaines plantes possédaient un nombre augmenté de hampes florales, ce phénotype étant souvent associé avec un nombre accru de feuilles effilées. Les quarante plantes T1 RNAi ont été amenées à graines et des plantes T2 RNAi ont également été analysées en parallèle avec des plantes T2 contrôles. Les plantes T2 descendantes de chaque plante T1 RNAi ont été notées de A à H. Les mêmes types de phénotypes que les plantes T1 RNAi ont été retrouvés chez les plantes T2 (figure 19).

Nous avons voulu analyser si les phénotypes observés dans les plantes RNAi ciblant TFIIIAbis, étaient associés avec une variation du taux global d'ARNr 5S. Pour cela, des extractions d'ARN ont été effectuées sur différentes plantes RNAi T1 et T2, ainsi que sur des plantes contrôles. Nous avons testé si les lignées RNAi ayant un phénotype, possédaient une diminution de leur quantité d'ARNm TFIIIAbis. Les ARN provenant des plantes RNAi et des plantes contrôles ont été utilisés pour des expériences de RT-PCR amplifiant soit TFIIIAbis (avec les primers TF3A19 et TF3A18, voir figure 14B), soit TFIIIAbis et TFIIIA simultanément (avec les primers TF3A17 et TF3A18, voir figure 14B) ; l'amplification de

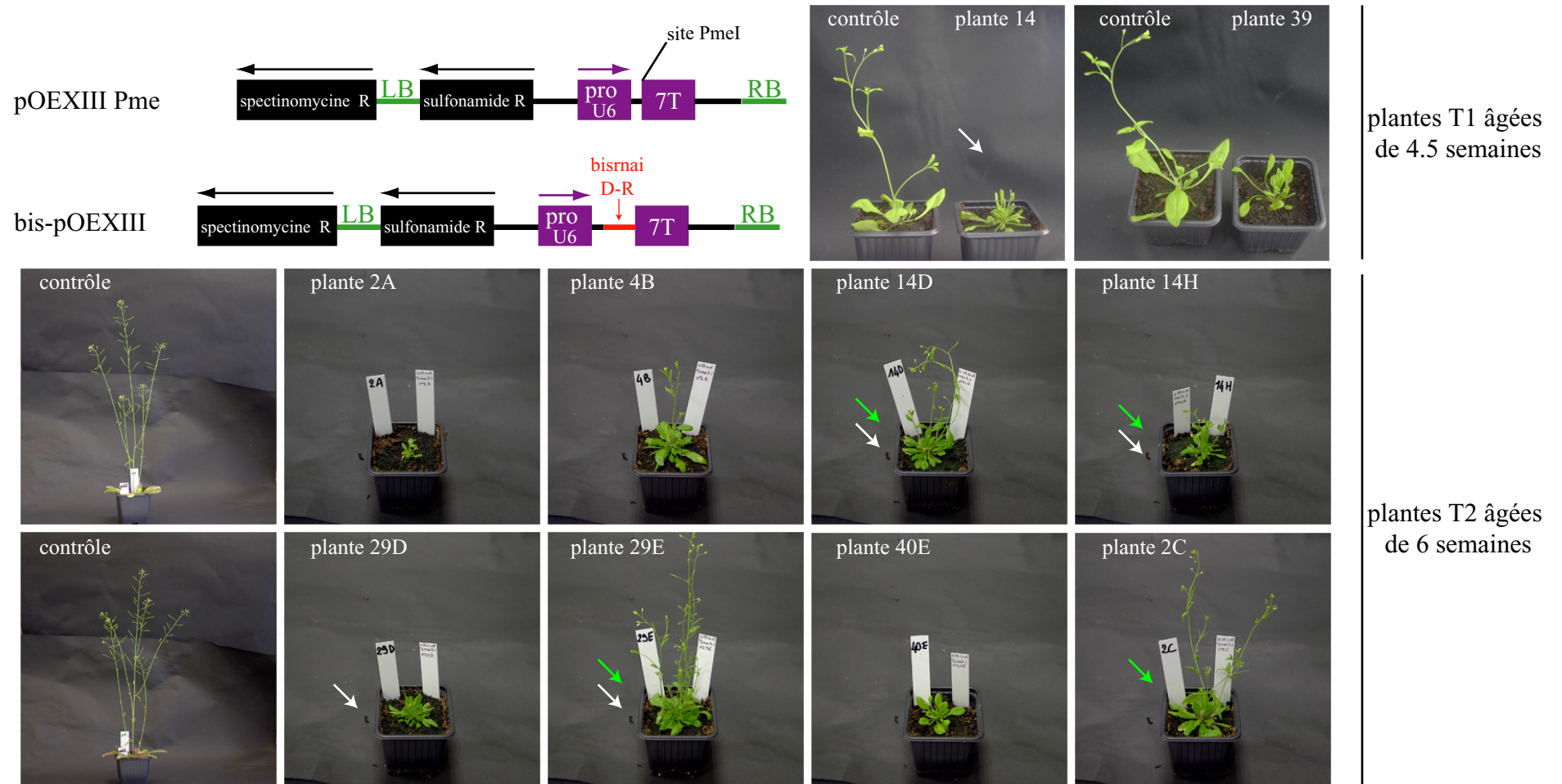


Figure 19: Le RNAi de TFIIIAbis entraîne des phénotypes au niveau des plantes.

Les cartes du vecteur pOEXIII Pme vide et du vecteur bis-pOEXIII (contenant le fragment bisrnai D-R) sont schématisées en haut à gauche; ces vecteurs ont été utilisés pour transformer des boutons floraux de plantes. Les plantes notées "contrôle" sont transformantes pour le vecteur pOEXIII Pme vide. Les plantes RNAi peuvent posséder différents phénotypes comme un nombre augmenté de feuilles et qui sont peu larges (flèches blanches), et/ou un nombre de hampes florales élevé (flèches vertes). De plus, toutes les plantes RNAi présentées ont un retard de croissance.

LB: left border; RB: right border; T1 et T2: respectivement, première et deuxième génération de plantes transformantes.

l'actine 2 correspondant à chaque extraction a servi de contrôle interne. Aucune variation significative de la quantité des ARNm de TFIIIAbis et de TFIIIA ainsi amplifiés, n'a été observée (données non montrées). Il n'est pas rare que la détection par RT-PCR d'un ARN ciblé par une technique de RNAi, ne permette pas d'observer une diminution de la quantité de cet ARN.

Les ARN provenant des plantes RNAi et des plantes contrôles ont servi à des expériences de northern blots à l'aide d'une sonde RAN puis d'une sonde ADNr 5S (figure 20). Les différents signaux ont été quantifiés et les signaux ARNr 5S ont été normalisés par les signaux RAN ; chaque valeur a été rapportée à la valeur contrôle (issue de plantes contrôles) (figure 20). Les résultats montrent une réduction du taux global d'ARNr 5S allant d'un facteur 1.5 (pour la plante rna1 29E) jusqu'à un facteur supérieur à 3 (pour la plante rna1 14), par rapport au taux global d'ARNr 5S des plantes contrôles. Le fait que cette réduction soit observée au niveau de plantes issues d'évènements de transformations indépendants par la construction RNAi (correspondant aux « lignées » 2, 4, 14, 29, 39 et 40) appuie la conclusion que le RNAi dirigé contre TFIIIAbis induit une réduction de la quantité globale des ARNr 5S. Toutefois, ce type d'expérience ne permet pas de distinguer si dans ces lignées RNAi, la diminution de la quantité des ARNr 5S est due à une réduction de transcription ou à une moindre stabilité des ARN.

Nous avons envisagé différentes expériences pour compléter notre étude de TFIIIAbis. Celles-ci sont présentées dans la partie « Discussion et Perspectives » de ce manuscrit.

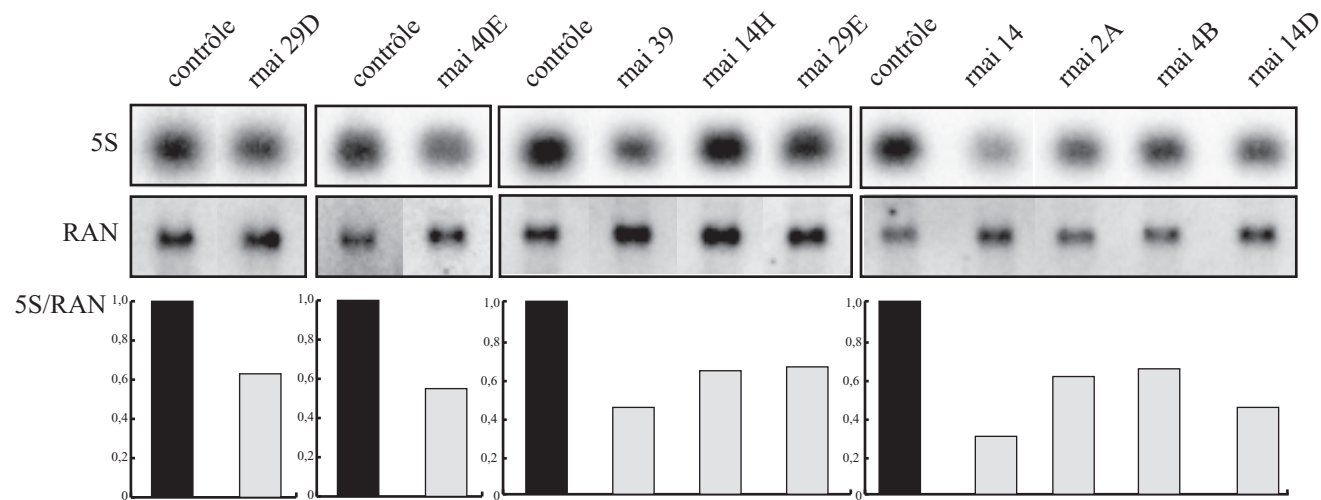


Figure 20: Taux global d'ARNr 5S des plantes transformantes.

Des northern blots, avec des ARN de plantes contrôles et de plantes RNAi TFIIIAbis, ont été hybridés successivement avec une sonde RAN (RAS-related nuclear protein) et une sonde ADNr 5S (au milieu et en haut de la figure, respectivement). Les signaux ont été quantifiés et chaque signal 5S a été rapporté au signal RAN correspondant (en bas). Plantes 39 et 14: plantes T1; plantes 29D, 40E, 14H, 29E, 2A, 4B, et 14D: plantes T2.

Matériels et Méthodes

Amplification de TFIIIA et TFIIABis

Les ADNc de TFIIIA et TFIIABis ont été amplifiés simultanément en utilisant les primers TF3A1 (5' -ATGGCGGAAGAAGCTAAAGTTG- 3') et TF3A2 (5' -CTAGCAAGTTTCGTGTTCTTCT- 3') sur une banque d'ADNc de cellules d'*Arabidopsis*. Ces produits PCR ont été clonés en PGEM-T easy puis séquencés.

Des ARN de cellules d'*Arabidopsis*, de feuilles, de fleurs et de racines ont été DNasés (DNase Roche) puis reverse-transcrits (Expand Roche) avec le primer TF3A2 et amplifiés par PCR avec les primers TF3A17 (5' -CTCACTTGAAGCAGCATATGC- 3') et TF3A18 (5' -TCCTGATGCTTTTGAAGCTGTG - 3'). Des ARN de feuilles de plantes RNAi et de plantes contrôles ont été DNasés et reverse-transcrits de la même façon qu'au-dessus, et amplifiés par PCR soit avec les primers TF3A17 et TF3A18 pour amplifier simultanément TFIIIA et TFIIABis, soit avec les primers TF3A19 (5' -AGGTCTTACCTATGTTATTGCG- 3') et TF3A18 pour amplifier uniquement TFIIABis.

Clonage de TFIIIA et TFIIABis, et purification de protéines recombinantes

Les ADNc de TFIIIA et TFIIABis ont été amplifiés grâce à des primers possédant un site de restriction BamHI puis clonés dans le vecteur d'expression pGEX-5X-1 comme décrit dans la partie matériels et méthodes de l'article n°1 (Mathieu et al., 2003).

Ces constructions ainsi que le vecteur pGEX-5X-1 vide ont été utilisés pour transformer des *E. coli* BLR (DE3 pLys). L'expression des protéines recombinantes a été effectuée comme décrit dans la partie matériels et méthodes de l'article n°1 (Mathieu et al., 2003). Les seules modifications apportées sont que les cultures de 200 ml ont été incubées à 37°C jusqu'à une D.O. (600nm) d'environ 0.6 avant induction, et que les cultures cellulaires après la phase d'induction ont été culottées par centrifugation à 4000g pendant 15 mn à 4°C, et reprises dans 10 ml de tampon PBS (phosphate-buffered saline) 1X froid.

Retards sur gel ADN et retards sur gel ARN

Ces expériences ont été réalisées comme décrit dans l'article n°1 (Mathieu et al., 2003).

Transcription *in vitro* et Expression transitoire des protéines de fusion GFP

Ces expériences ont été réalisées comme décrit dans l'article n°1 (Mathieu et al., 2003).

Transformation de plantes par le vecteur pOEXIII Pme, inducteur de RNAi

P. Pelczar (Zürich, Suisse) et J. Molinier (IBMP, Strasbourg) ont construit le vecteur pOEXIII Pme (données non publiées) à partir du vecteur pOEXhp (Molinier et al., 2004). Le vecteur pOEXIII Pme porte une résistance à la spectinomycine en bactérie, et une résistance à la sulfonamide en plantes. Le site de clonage qui a été utilisé est le site de restriction PmeI ; en amont de ce site, le vecteur porte un promoteur U6, et en aval, un terminateur polymérase III (7T). Le fragment bisrnai D-R de 132 pb correspondant à une partie de l'exon alternatif présent uniquement dans l'ADNc de TFIIIAbis, a été amplifié avec les primers bisrnaiD (5' -GGTCTTACCTATGTTATTGCGTGA- 3') et bisrnaiR (5' -GCGTGATCGAGGCTTACTTGCT- 3'), et cloné dans le vecteur pOEXIII en antisens au site PmeI. Cette construction a été appelée bis-pOEXIII.

Des cellules *Agrobacterium tumefaciens* (souche C58C1) ont été transformées avec les vecteurs bis-pOEXIII et pOEXIII Pme par électroporation, puis étalées sur milieu sélectif (spectinomycine 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Les cellules *Agrobacterium tumefaciens* transformées ont été cultivées à 29°C sous agitation jusqu'à une D.O.₆₀₀ de 0.6 à 0.8 en milieu 2YT sélectif (16 g tryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl, pH 7, spectinomycine 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Ces cellules ont été culottées par la suite, et resuspendues dans 100 ml de milieu d'infiltration (5 % sucrose, 0.1 M MgCl₂, 0.05 % Silwet ajouté extemporanément). Le milieu d'infiltration a été utilisé pour transformer des plantes *Arabidopsis thaliana*; les graines T1 (première génération de graines transformantes) ont été semées sur milieu sélectif (sulfonamide 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Les plantules T1 ont par la suite été repiquées sur terreau. Les plantes T1 ont été amenées à graines, et ces graines T2 aussi sélectionnées sur antibiotique pour générer les plantes transformantes T2.

Extraction d'ARN et northern blot

Les extractions d'ARN ont été effectuées comme décrit par Mathieu et al. (Mathieu et al., 2002) sur des plantes âgées de 4 à 5 semaines post-germination. Pour les analyses d'ARN, 2 μg d'ARN ont été déposés et migrés sur un gel agarose 1%, formaldéhyde 1%, puis transférés sur membrane Hybond-N+ (Amersham). Les sondes utilisées (RAN et 5S) ont été marquées avec des nucléotides α -³²P-dCTP par random priming d'hexamères (Megaprime DNA labeling system ; Amersham). Les quantifications des signaux des northern blots ont été effectuées au phosphorimager (Molecular Imager FX ; Bio-Rad).

Article n°2

**« Changes in 5S rDNA Chromatin Organization and Transcription during
Heterochromatin Establishment in Arabidopsis »**

Mathieu, O., Jasencakova, Z., **Vaillant, I.**, Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I. and
Tourmente, S. (2003)
Plant Cell, **15**, 2929-2939.

Comme évoqué dans la synthèse bibliographique (chapitre I, paragraphe 8), l'ADNr 5S est fortement méthylé au niveau de ses cytosines (Mathieu et al., 2002). De plus, dans cet article, il a été montré que la méthylation de l'ADNr 5S ne semble pas être un déterminant suffisant pour réprimer l'expression des gènes d'ARNr 5S. Par exemple, la déméthylation de l'ADNr 5S obtenue en cultivant des plantes sur un milieu contenant de la 5-azacytidine n'induit pas d'augmentation du taux global d'ARNr 5S. D'autre part, il avait été montré dans notre équipe qu'il existe deux types d'ARNr 5S : des ARN majoritaires et des ARN minoritaires (qui diffèrent des ARN majoritaires par la substitution d'une ou de deux bases) (Cloix et al., 2002). Nous avons voulu étudier l'impact de la méthylation de l'ADNr 5S et de la structure de la chromatine sur l'expression des ARNr 5S minoritaires. Nous avons utilisé des plantes traitées à la 5-azacytidine (dont l'ADN est hypométhylé) et des plantes mutantes *ddm1* (*DDM1* code une protéine de remodelage de la chromatine et sa mutation entraîne une décondensation de l'hétérochromatine centromérique et une diminution de la méthylation ADN). De plus, nous avons également étudié différents stades de développement et différents tissus de plantes sauvages.

Ainsi, la proportion d'ARNr 5S minoritaires a été corrélée au taux de méthylation de l'ADNr 5S : moins l'ADNr 5S est méthylé et plus le pourcentage d'ARNr 5S minoritaires est augmenté. En revanche, le taux global d'ARNr 5S suit la quantité du facteur de transcription *AtTFIIIA*. Ceci explique pourquoi dans des plantes traitées à la 5-azacytidine, il n'avait pas été détecté d'augmentation de l'expression globale des ARNr 5S (Mathieu et al., 2002).

En collaboration avec le laboratoire d'I. Schubert (Gatersleben, Allemagne), nous avons montré que dans des noyaux interphasiques, une partie de l'ADNr 5S co-localise avec les chromocentres (qui sont des structures hétérochromatiques) alors que le reste de l'ADNr 5S forme des boucles émanant de ces chromocentres. Nous avons émis l'hypothèse que la fraction des gènes d'ARNr 5S exprimée serait contenue dans les boucles, qui semblent porter des marques euchromatiques contrairement aux chromocentres. Une corrélation a pu être établie entre la proportion de boucles émanant des chromocentres et le pourcentage d'ARNr 5S minoritaires exprimés. En effet, dans des feuilles de plantes *ddm1* possédant un pourcentage élevé d'ARNr 5S minoritaires, les boucles sont plus fréquentes que dans des feuilles de plantes sauvages ayant un pourcentage d'ARNr 5S minoritaires négligeable. Dans les plantes *ddm1*, les boucles d'ADNr 5S seraient de plus grande taille et contiendraient donc plus de gènes d'ARNr 5S minoritaires (par rapport à des plantes sauvages) qui se trouveraient dans un contexte chromatinien favorable à la transcription.

Ma contribution expérimentale à cette étude a été d'analyser les patrons de méthylation de l'histone H3 au niveau des lysines 4 et 9 par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) que j'ai effectuées au sein de l'équipe de V. Colot (Evry, France). Ainsi, j'ai pu montrer que dans des plantes sauvages, l'ADNr 5S est majoritairement associé à la diméthylation H3K9 alors qu'une petite fraction de l'ADNr 5S est associée avec la diméthylation H3K4. Dans des plantes *ddm1*, ces proportions sont inversées suggérant ainsi que davantage de gènes d'ARNr 5S possèdent une caractéristique euchromatique. De plus, le séquençage des produits d'amplification issus des expériences de ChIP, a permis de connaître l'origine génomique des unités 5S immunoprécipitées. De cette façon j'ai constaté que dans les plantes sauvages, les loci 5S transcrits sont plus enrichis en H3K9me2 que les loci 5S non transcrits, alors que H3K4me2 semble réparti de manière uniforme sur tous les loci. Dans le mutant *ddm1*, ces loci 5S transcrits voient la diméthylation H3K4 augmenter et la diméthylation H3K9 diminuer. Ces résultats montrent que dans des plantes *ddm1*, les loci transcrits acquièrent des caractéristiques euchromatiques, ce qui est en accord avec des boucles 5S plus importantes et l'augmentation de la quantité d'ARNr 5S minoritaires.

Changes in 5S rDNA Chromatin Organization and Transcription during Heterochromatin Establishment in Arabidopsis

Olivier Mathieu,^a Zuzana Jasencakova,^b Isabelle Vaillant,^a Anne-Valérie Gendrel,^c Vincent Colot,^c Ingo Schubert,^b and Sylvette Tourmente^{a,1}

^a Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique, 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France

^b Department of Cytogenetics, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, D-06466 Gatersleben, Germany

^c Unité de Recherche en Génomique Végétale, Institut National de la Recherche Agronomique–Centre National de la Recherche Scientifique, 91057 Evry Cedex, France

In the *Arabidopsis* accession Columbia, 5S rDNA is located in the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4, and 5. Both a major and some minor 5S rRNA species are expressed from chromosomes 4 and 5, whereas the genes on chromosome 3 are not transcribed. Here, we show that 5S rDNA methylation is reduced in 2-day-old seedlings versus 4-day-old or older aerial plant tissues, and the minor 5S rRNA species are expressed most abundantly at this stage. Similarly, when 5S rDNA is demethylated by 5-azacytidine treatment or via the *decrease in DNA methylation1* (*ddm1*) mutation, the expression of minor 5S rRNA species is increased. We also show that in leaf nuclei of mature wild-type plants, the transcribed fraction of 5S rDNA forms loops that emanate from chromocenters. These loops, which are enlarged in nuclei of mature *ddm1* plants, are enriched for histone H3 acetylated at Lys-9 and methylated at Lys-4 compared with the heterochromatic chromocenters. Up to 4 days after germination, heterochromatin is not fully developed: the 5S rDNA resides in prechromocenters, does not form conspicuous loops, and shows the lowest transcription level. Our results indicate that the expression and chromatin organization of 5S rRNA genes change during heterochromatin establishment.

INTRODUCTION

Heterochromatin is cytologically defined as highly condensed chromatin (Heitz, 1928). *Arabidopsis* chromosomes ($n = 5$) display small, conspicuous heterochromatin segments (chromocenters) that mark the position of each (peri-)centromere and of the nucleolus-organizing regions of chromosomes 2 and 4 (Fransz et al., 1998, 2002). Chromocenters contain most of the repetitive DNA sequences, constituting ~15% of the *Arabidopsis* genome. The heterochromatin of many eukaryotes, including *Arabidopsis*, is marked by the methylation of DNA and of histone H3 at Lys-9 (H3K9) (Zhang and Reinberg, 2001; Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002; Soppe et al., 2002; Jasencakova et al., 2003), whereas euchromatin is marked by H3 at Lys-4 (H3K4) methylation and H3K9 acetylation. At the level of the genes, the acetylation of histone tails and the methylation of histone H3 at Lys-4 (H3mK4) correspond to “open” chromatin that is potentially active in transcription, whereas the deacetylation of histones, cytosine methylation, and the methylation of Lys-9 of histone H3 (H3mK9) correspond to “closed” chromatin that is repressed for transcription (Bird and Wolffe, 1999; Turner, 2000; Gendrel et al., 2002; Kouzarides, 2002; Lachner and Jenuwein, 2002).

Soppe et al. (2002) have shown that DECREASE IN DNA METHYLATION1 (DDM1) and METHYLTRANSFERASE1 (MET1)

control heterochromatin assembly at chromocenters by their influence on DNA maintenance methylation at CG sites and subsequently on the methylation of H3K9. The *DDM1* gene encodes a chromatin-remodeling protein (Jeddeloh et al., 1999; Brzeski and Jerzmanowski, 2003), and MET1 encodes a CG-specific maintenance methyltransferase (Finnegan and Kovac, 2000). The reduction of H3mK9 in the *ddm1* background has been correlated to the transcriptional derepression of genes, transgenes, and transposons using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays and cytological analysis (Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002; Probst et al., 2003). Nuclei from *ddm1* and *met1* mutants show a reduction of heterochromatin content as a result of the dispersion of pericentromeric sequences away from heterochromatic chromocenters (Soppe et al., 2002). The *ddm1* mutation also is known to cause a striking decondensation of chromocenters (Probst et al., 2003).

Arabidopsis contains ~1000 copies of 5S rDNA per 1C genome arranged in tandem arrays (Campbell et al., 1992) within the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4, and 5 (with a large locus on the left arm and a small locus on the right arm of chromosome 5) in the Columbia accession (Murata et al., 1997; Fransz et al., 1998). We have shown that 5S rDNA is, on average, methylated at 79% of cytosines in CG, CNG, and asymmetrical contexts (Mathieu et al., 2002b) and that the density of DNA methylation increases from euchromatin toward pericentromeric heterochromatin (Mathieu et al., 2002a). *Arabidopsis* expresses a major 5S rRNA transcript and some minor species that differ from the major transcript by one or two base substitutions. The 5S rDNA units homologous with major and

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail sylvette.tourmente@univ-bpclermont.fr; fax 33-4-73-40-77-77. Article, publication date, and citation information can be found at www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.017467.

minor 5S rRNA transcripts have been identified and belong to chromosome 4 as well as to the large block of chromosome 5 (Cloix et al., 2002).

Here, we report that 5S rRNA genes undergo changes in chromatin organization and transcription during the early development of the leaf. In adult plant leaf nuclei, the 5S rDNA is found both in condensed chromocenters and in loops that emanate from the chromocenters. The loops are undermethylated and enriched for histones modified with H3K9 acetylation and H3K4 methylation; therefore, they presumably correspond to the transcribed fraction of major 5S rRNA genes. This chromatin organization of the 5S rRNA genes occurs between 2 and 4 days after germination. In 2-day-old seedling nuclei, only small prechromocenters are visible and the overall expression of 5S rRNA genes is low. 5S rDNA is undermethylated compared with later stages of development, and there is enriched expression of the minor 5S rRNA genes. Similarly, demethylation of 5S rDNA by 5-azacytidine or by the *ddm1* mutation enriches minor 5S rRNA gene expression. These findings suggest that the major and minor 5S rRNA genes have different patterns of chromatin organization and correspondingly different patterns of expression.

RESULTS

5S rDNA Methylation

In plants and mammals, DNA of heterochromatin contains a significant amount of 5-methylcytosine (5mC), and 5S rDNA is highly methylated in *Arabidopsis* (Mathieu et al., 2002b). The methylation frequency of 5S rDNA cytosine residues was estimated by DNA gel blot analysis of genomic DNA after digestion with HpaII and quantifying the 0.5-kb band that corresponds to monomeric units of 5S rDNA and whose intensity is inversely proportional to the methylation frequency (Figure 1A; five repetitions per experimental point). HpaII is inhibited by the methylation of either C in the sequence 5'-CCGG-3'. As expected, in mature leaves of the *ddm1* mutant (Vongs et al., 1993) and of wild-type plants treated with the cytosine methylation inhibitor compound 5-azacytidine (5-azaC) (Jones, 1985; Haaf, 1995), 5S rDNA was methylated much less significantly than in leaves of untreated wild-type plants (Mann-Whitney *U* test [*U*], 1% level of significance). In adult wild-type plants, 5S rDNA was methylated equally in leaves, stems, and green siliques (*U*, *P* > 0.01). 5S rDNA was less methylated in roots and more methylated in flowers compared with 3-week-old wild-type leaves (*U*, *P* < 0.01). Four-day-old leaves (roots removed from 4-day-old seedlings) showed a 5S rDNA methylation level comparable to that of 3-week-old leaves (*U*, *P* > 0.01). However, soon after germination (2 days), 5S rDNA methylation was reduced significantly relative to that in 4-day-old and 3-week-old leaves (*U*, *P* < 0.01).

5S rRNA Amounts and 5S rRNA Heterogeneity

To investigate 5S rRNA transcription, we performed RNA gel blot experiments together with reverse transcriptase-mediated (RT) PCR analysis. RNA gel blots revealed a constant 5S rRNA

amount in mature 3-week-old leaves and stems and 4-day-old leaves (*U*, *P* > 0.01), whereas only 30% of this amount appeared in 2-day-old seedlings (*U*, *P* < 0.01). Flowers, siliques, and roots had two to three times more and seeds had six times more 5S rRNA than was detected in leaves (*U*, *P* < 0.01). In mature leaves of *ddm1* and of 5-azaC-treated plants, the same quantity of 5S rRNA was present as in wild-type leaves (Figure 1B) (*U*, *P* > 0.01).

To analyze the relative expression levels of the heterogeneous 5S rRNA species, we performed RT-PCR experiments on total RNA samples (Table 1). For each sample, two to four independent RNA purifications followed by RT-PCR were pooled before sequencing. Contaminating 5S genomic rDNA was totally removed by DNase I treatment (see Methods). Mature wild-type leaves, green siliques, flowers, and 4-day-old leaves contained a low proportion (~3.25%) of minor 5S rRNAs. In mature wild-type 3-week-old leaf tissue, minor 5S rRNA genes were repressed and heterochromatin was fully established (see below); therefore, this stage was used as a reference. Significantly (Fisher's exact test; see Methods), higher minor 5S rRNAs proportions were observed in 2-day-old seedlings, in roots, and in 5-azaC-treated and *ddm1* plants (13.2 to 22.7%). In mature seeds, 13.6% of 5S rRNA were minor RNAs accumulated during embryogenesis.

These results reveal that in hypomethylated plants (5-azaC-treated and *ddm1*) as well as in some tissues (roots) and soon after germination (2 days) when 5S rDNA methylation was lower, additional 5S rRNA genes were transcribed to produce minor 5S rRNA species. By contrast, 4-day-old and 3-week-old wild-type leaves, which shared equivalent 5S rRNA amounts and 5S rDNA methylation levels, contained the same low proportion of minor 5S rRNAs.

Correlation between 5S rRNA Heterogeneity, 5S rDNA Methylation, and Plant Development

The 5S rRNA heterogeneity, 5S rDNA methylation, and 5S rRNA amount results summarized in Table 2 led us to the following conclusions. (1) There was no correlation between 5S rRNA amount and 5S rDNA methylation. (2) There was no correlation between the 5S rRNA amount and the proportion of minor 5S rRNAs. (3) There was an inverse correlation between the proportion of minor 5S rRNAs and the 5S rDNA methylation level. In other words, the less the 5S rDNA was methylated, the higher was the minor 5S rRNAs proportion, although this relationship was not strictly linear. (4) Two-day-old seedlings contained a lower 5S rDNA methylation level and a higher proportion of minor 5S rRNAs compared with 4-day-old or 3-week-old leaves.

AtTFIIIA mRNA Levels Correlate with 5S rRNA Levels

Because the 5S rRNA amount was correlated neither with the proportion of minor 5S rRNAs nor with 5S rDNA methylation, we explored whether the 5S rDNA-specific transcription factor AtTFIIIA (Mathieu et al., 2003) could act as a limiting factor for 5S rDNA expression. This transcript cannot be detected by RNA gel blot analysis. Instead, AtTFIIIA mRNA quantities were

estimated by semiquantitative RT-PCR for the same RNA samples that were analyzed for 5S rDNA transcription, with five independent replicates of each experiment.

The results revealed a good correlation between *AtTFIIIA* mRNA (Figure 1C) and overall 5S rRNA amounts (Figure 1B). For example, siliques and seeds, which contained the highest 5S rRNA amounts, also accumulated the highest amounts of *AtTFIIIA* mRNA. Flowers and roots contained slightly higher *AtTFIIIA* mRNA levels and two times more 5S rRNA than leaves. Although in *ddm1* and 5-azaC-treated leaves additional minor 5S rRNA genes were transcribed, no significant increase in *AtTFIIIA* mRNA amounts was observed between these hypomethylated backgrounds and wild-type leaves. This result is in agreement with the presence of equivalent 5S rRNA quantities in *ddm1*, 5-azaC-treated, and wild-type leaves (Figure 1B). Together, these results suggest that *AtTFIIIA* is a limiting factor for the transcription of 5S rRNA genes. The one exception to

this general pattern was found in 2-day-old seedlings, which contained similar levels of *AtTFIIIA* mRNA to more mature tissues but which expressed only 30% as much 5S rRNA.

Nuclei of 2-Day-Old Seedlings Contain Prechromocenters and Reduced Amounts of Heterochromatin

A possible explanation for the reduced expression of total 5S rRNA transcripts in 2-day-old seedlings is that the appropriate chromatin structure for optimal 5S rDNA transcription is not fully formed at this stage. Therefore, we used cytological methods to investigate the chromatin structure of 5S rDNA at 2 days after germination versus later stages. Four-day-old and 3-week-old leaf nuclei of *ddm1* showed on average smaller chromocenters (CCs), based on their 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining intensity, than did corresponding wild-type nuclei. In 2-day-old nuclei from roots as well as from cotyledons

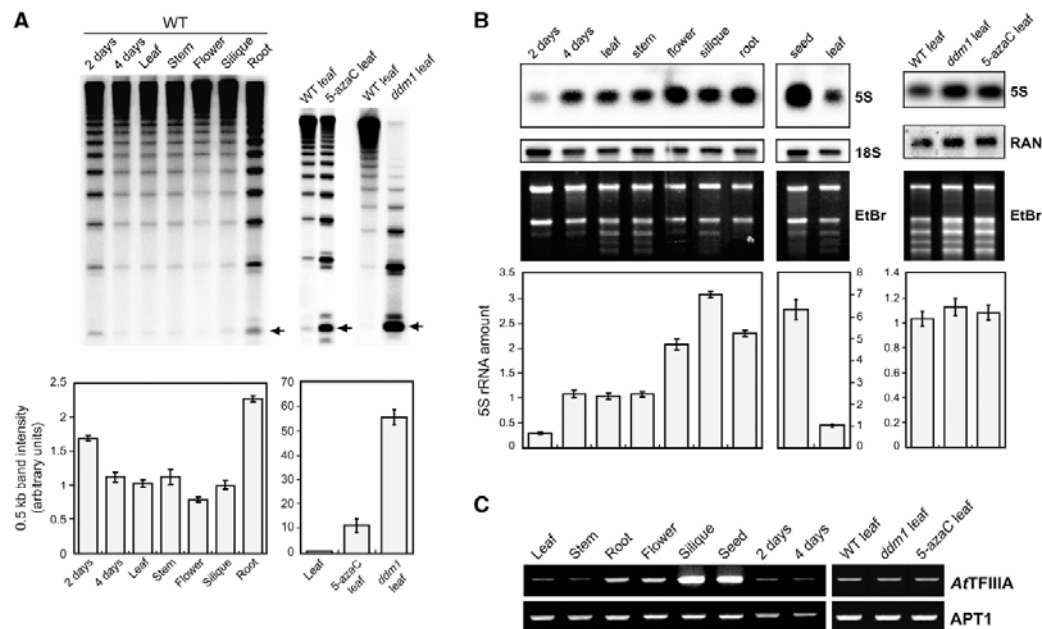


Figure 1. 5S rDNA Methylation, Quantitative 5S rDNA Transcription, and *AtTFIIIA* Expression Pattern.

(A) DNA methylation of 5S rDNA. Genomic DNA was prepared from different tissues and developmental stages and from leaves of 5-azaC and *ddm1* plants, digested with *Hpa*I, and probed by 5S rDNA on gel blots. 5S rDNA methylation was estimated by quantifying the intensity of the 0.5-kb band (normalized with the whole-line radioactivity), which corresponds to monomeric units of 5S rDNA (arrows). Quantifications of five independent experiments are presented in the histograms below the gels, and the standard deviation of the mean is indicated on each bar. WT, wild type.

(B) 5S rRNA amounts in various organs, developmental stages, and hypomethylated plants. Total RNA was hybridized using a 5S rDNA probe. RNA quantities in each line were normalized using the 18S rRNA or a RAS-related nuclear protein (Haizel et al., 1997) probe together with the ethidium bromide (EtBr) profile, and 5S rRNA amounts were quantified accordingly. The results of five independent experiments are represented in the corresponding histograms, and the standard deviation of the mean is indicated on each bar. Results obtained from seeds are presented separately, because another RNA purification method was used (see Methods). For comparison, total RNA from wild-type mature leaves also was purified using this method.

(C) Expression pattern of *AtTFIIIA* mRNA. Transcriptional analysis of *AtTFIIIA* was performed by semiquantitative RT-PCR. Expression of the constitutive *APT1* gene was used to normalize the amounts of cDNA.

Table 1. Proportion of Minor 5S rRNAs

Sample	Number of Minor 5S rRNA Clones	Total Clones ^a	Percent of Minor 5S rRNAs	Significance Level ^b
Wild type				
3-week-old leaf	2	103	1.9	Reference
2-day-old seedling	9	53	17	0.001*
4-day-old leaf	1	56	1.8	0.717
Seed	6	44	13.6	0.009*
Root	7	53	13.2	0.008*
Silique	3	51	5.9	0.203
Flower	2	58	3.4	0.456
<i>ddm1</i>				
3-week-old leaf	12	54	22.2	0.00005**
2-day-old seedling	11	55	20	0.0002**
5-azaC (1mM)	10	44	22.7	0.0001**
3-week-old leaf				

^aTotal clones = number of minor 5S rRNA clones recovered + number of major 5S rRNA clones recovered.

^bSignificance levels are as follows: *, 0.01; **, 0.001 (Fisher's exact test [see Methods]).

of wild-type and *ddm1* plantlets, the CCs were smaller than those in corresponding 4-day-old and 3-week-old leaf nuclei and were considered to represent prechromocenters (pre-CCs) (Figure 2A). The heterochromatin content was quantified by measuring the area and staining intensity of CCs/pre-CCs in relation to that of the entire nucleus (Figure 2B). In agreement with previous data (Soppe et al., 2002), a chromocenter fraction reduced by nearly one-third compared with that of wild-type nuclei was found in *ddm1* leaf nuclei of 3-week-old plants. The observation that the chromocenter fraction of wild-type and *ddm1* 2-day-old nuclei amounts to approximately half of that measured in leaf nuclei of 4-day-old and 3-week-old wild-type plants (Figure 2B) reveals a developmental dynamic for constitutive heterochromatin and suggests that CCs become fully de-

veloped at 4 days after germination in Arabidopsis leaves. Our results also suggest that there is a comparable development of heterochromatin in the wild type and *ddm1* between 2 and 4 days, although this process is less efficient in *ddm1*, in which mature CCs remained smaller.

Because 2-day-old plantlets contained a lower 5S rDNA methylation level, a lower total 5S rRNA amount, a higher minor 5S rRNA proportion, and a smaller heterochromatin fraction compared with 4-day-old and 3-week-old leaf nuclei, we conclude that there is a switch in 5S rDNA transcriptional activity between days 2 and 4 after germination, correlating with the establishment of mature heterochromatin.

5S rDNA "Loops" Emanate from the CCs in 3-Week-Old but Not in 2-Day-Old Nuclei

The smaller CCs of *ddm1* 3-week-old leaf nuclei were shown to contain less DNA as a result of the dispersion of low-copy pericentromeric sequences away from the CCs (Soppe et al., 2002). The higher proportion of minor 5S rRNAs and the lower level of 5S rDNA methylation together with the smaller size of CCs in *ddm1* versus wild-type 3-week-old nuclei led us to ask whether 5S rDNA also was dispersed away from CCs in *ddm1* 3-week-old plants. Fluorescent in situ hybridization (FISH) with 5S rDNA yielded signals both within and outside the CCs in *ddm1* 3-week-old nuclei but also, surprisingly, in wild-type 3-week-old nuclei (Figures 3A and 3B). Counting of 5S rDNA signals at CCs versus signals outside CCs indicated that loop-forming 5S rDNA signals were significantly (χ^2 test, $P < 1\%$) more frequent in *ddm1* ($n = 54$ nuclei) than in the wild type ($n = 58$ nuclei) (ratio of nonloop to loop 5S rDNA signals = 1:3.1 and 1:1.8, respectively). Such loops could be observed for CC4 (chromocenter 4), identified by the presence of both 5S rDNA and 45S rDNA signals, as well as for other 5S rDNA-bearing CCs, such as CC3 and CC5, that could not be discriminated cytologically.

In nuclei of wild-type and *ddm1* 2-day-old plantlets, the 5S rDNA probe hybridized only to the heterochromatic pre-CCs (Figure 3C). The absence of loop-forming signals suggests that

Table 2. Relative 5S rRNA Amounts, Proportions of Minor 5S rRNAs, and Levels of 5S rDNA Methylation

Feature	Wild Type								<i>ddm1</i>		
	Root	2d ^a	4d ^b	Leaf ^c	Stem	Flower	Silique	Seed	2d ^a	3w ^d	5-azaC ^e
Relative 5S rRNA amount	2.3 ^f	0.3 ^f	1.1	1	1.1	2 ^f	3.1 ^f	6.3 ^f	nd ^g	1.1	1.1
Minor 5S rRNAs (%)	13.2 ^h	17 ^h	1.8	1.9	nd	3.4	5.9	13.6 ^h	20 ^h	22.2 ^h	22.7 ^h
Relative 5S rDNA methylation (%) ⁱ	44.4 ^f	59.5 ^f	89.3	100	88.5	125.5 ^f	103.9	nd	1.1 ^f	1.8 ^f	9 ^f

^aTwo days after germination.

^bFour days after germination.

^cThree-week-old leaf, used as a reference in the table.

^dThree-week-old leaf.

^e5-Azacytidine-treated (1 mM) 3-week-old leaf.

^fSignificantly different from reference by Mann-Whitney *U* test (1% level of significance).

^gnd, not determined.

^hSignificantly different from reference by Fisher's exact test (see Table 1).

ⁱCompared with 3-week-old leaf; see Methods for calculation.

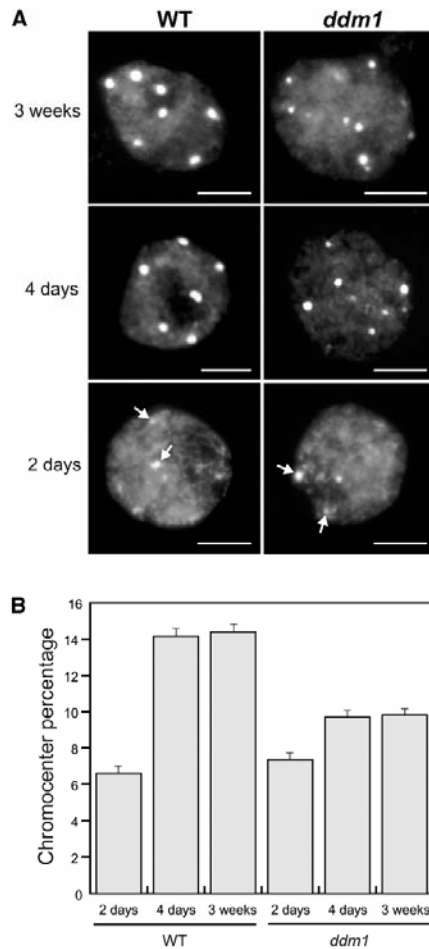


Figure 2. Nuclei from 2-Day-Old Postgermination Seedlings Contain Less Heterochromatin Than Nuclei from Leaves of 4-Day-Old and 3-Week-Old Plants.

(A) Representative DAPI-stained leaf nuclei from 2-day-old seedlings and 4-day-old seedlings and leaves of 3-week-old wild-type (WT) and *ddm1* plants. *ddm1* leaf nuclei of 3-week-old plants contain smaller chromocenters than corresponding wild-type nuclei. In nuclei from 2-day-old seedlings, small, weakly stained prechromocenters are visible (arrows). Bars = 5 μ m.

(B) Chromocenter fractions of 2-day-old, 4-day-old, and 3-week-old nuclei of Arabidopsis wild type and *ddm1*. Percentages are derived from measurements of 60 to 68 nuclei each, and the standard error of the mean is indicated on each bar. In the wild type and *ddm1*, 4-day-old and 3-week-old nuclei have equivalent chromocenter fractions ($P > 0.05$), whereas the chromocenter fraction of 2-day-old nuclei is significantly different ($P < 0.05$). All *ddm1* values are significantly different from wild-type values ($P < 0.05$) except for those from wild-type 2-day-old versus *ddm1* 2-day-old plants ($P > 0.05$).

no significant part of 5S rDNA disperses away from heterochromatin in these nuclei. This observation is consistent with the view that 5S rDNA expression was reduced in 2-day-old plantlets because the appropriate chromatin structure had not yet formed.

H3K9 Acetylation and H3K4 Methylation Are Not Detectable at 2-Day Pre-CCs

Histone H3 acetylated at Lys-9 (H3AcK9) and H3mK4 are two histone modifications often associated with transcriptionally active chromatin. Immunolabeling of 2-day-old and 3-week-old nuclei from wild-type and *ddm1* plants using antibodies recognizing specifically H3AcK9 or H3mK4 revealed no signals at CCs/pre-CCs (Figures 4A and 4B). The size of the area free of signals correlated with the size of CCs and pre-CCs. The remaining chromatin, which likely includes the 5S rDNA loops in 3-week-old leaf nuclei, revealed consistently stronger H3AcK9 and H3mK4 signals. In nuclei of 2-day-old wild-type and *ddm1* plantlets, although the heterochromatin was not fully developed (as shown above), the labeling pattern indicated that in both cases pre-CCs were less acetylated at H3K9 and less methylated at H3K4 than was euchromatin, as were the larger CCs of mature leaves.

H3mK9 Is Present at Pre-CCs on 2-Day-Old Nuclei but Reduced at 5S rDNA Loops in 3-Week-Old Leaf Nuclei

Strong methylation of H3K9 has been found to be a typical feature of wild-type heterochromatin (see Introduction). At 3 weeks old, immunosignals obtained with antibodies directed against dimethylated K9 of H3 were clustered at the CCs (Figure 4C), whereas the area and intensity of signals were reduced strongly in *ddm1* CCs (Soppe et al., 2002) compared with the wild type. 5S rDNA loops were not labeled or were less labeled with H3mK9, suggesting a euchromatic structure (Figure 4D). At 2 days old, both wild-type and *ddm1* nuclei pre-CCs revealed heterochromatic features such as H3mK9 and the absence of both H3mK4 and H3AcK9 (Figures 4A to 4C). At this stage, 5S rDNA did not form loops and largely colocalized with the heterochromatic pre-CCs. This chromatin organization may underlie the less efficient 5S rRNA transcription observed in 2-day-old plantlets (Figure 1B).

Small 2-Day-Old Pre-CCs Are Already DNA Methylated

We compared the distribution patterns of methylated DNA in 2-day-old and 3-week-old nuclei of both wild-type and *ddm1* plants using antibodies against 5mC. Wild-type 3-week-old nuclei showed strong signals, especially at CCs, whereas in *ddm1* 3-week-old nuclei, the immunosignals were dispersed and not clustered at CCs, as observed previously (Soppe et al., 2002). In 2-day-old nuclei of wild-type and *ddm1* plantlets, the immunosignals were distributed nearly uniformly and not restricted to pre-CCs (Figure 5). Although DNA methylation was present at 2 days after germination, pre-CCs were not fully developed and were smaller than those in adult leaves.

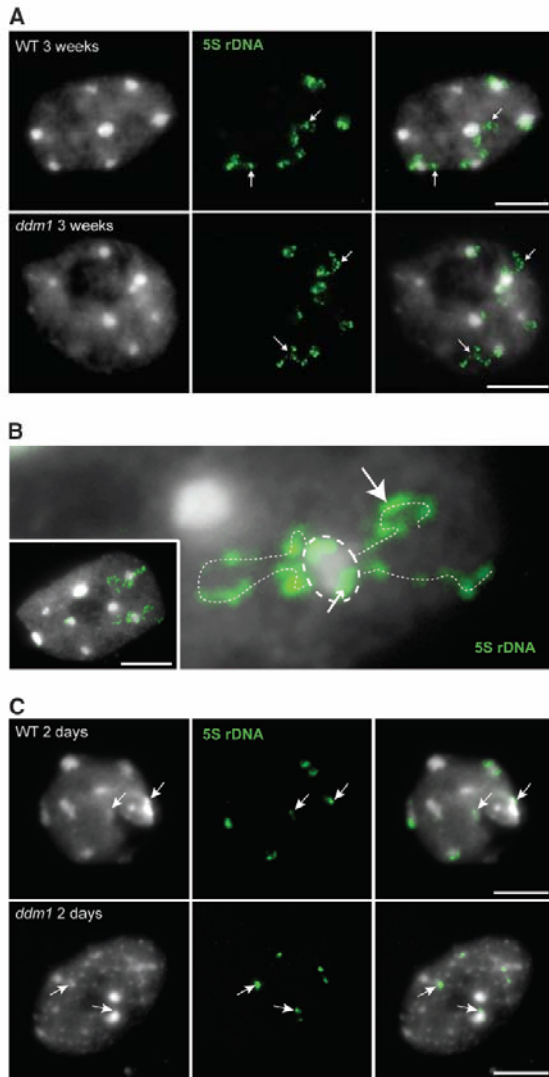


Figure 3. 5S rDNA Loops Emanate from Chromocenters in Nuclei of 3-Week-Old Plants.

FISH with a 5S rDNA probe (green) on 3-week-old (**A**) and 2-day-old (**C**) nuclei from wild-type (WT) and *ddm1* plants (loops indicated by arrows in **A**). (**B**) shows an enlargement of a wild-type nucleus (inset) from a 3-week-old plant with 5S rDNA loops (interrupted white lines) emanating from a chromocenter (circled). Parts of the 5S rDNA signal are located in the heterochromatic chromocenter (small arrow), and other parts form loops within euchromatin (large arrow). In 2-day-old postgermination seedling nuclei (**C**), 5S rDNA is located at prechromocenters (arrows). Counterstaining with DAPI (left in **A**) and **C**), FISH with the 5S rDNA probe (middle in **A**) and **C**), and the merge of both (**B**) and right in **A**) and **C**) are shown. Bars = 5 μ m.

Transcribed 5S rDNA Loci Are Less Associated with H3mK9 in *ddm1* Nuclei

The hypomethylation of 5S rDNA in the *ddm1* background (Figure 1A) was correlated with an increased proportion of minor 5S rRNAs (Table 1), indicating the transcription of additional 5S rRNA genes. It was shown previously that in *ddm1* heterochromatin, DNA methylation is reduced strongly and H3mK9 is replaced by H3mK4. This pattern has been observed at reactivated genes and transposons (Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002) and for regions that are dispersed from CCs (Soppe et al., 2002). We analyzed histone H3 methylation patterns of 5S rDNA from wild-type and *ddm1* mature plants by ChIP using antibodies raised against H3 dimethylated at K9 and H3 dimethylated at K4 peptides. To validate the immunoprecipitation step, four different controls were used: the phosphofructokinase β -subunit gene (At4g04040), the Cinfu-like retrotransposon (T5L23.29), the *ACT1N* gene, and the Ta2 transposon. Because our ChIP-PCRs yielded the previously described patterns for all four sequences (Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002), we used the immunoprecipitations for subsequent 5S rDNA-specific PCR procedures.

In wild-type plants, 5S rDNA was associated mostly with H3mK9, whereas a smaller fraction was associated with H3mK4 (Figure 6). In *ddm1*, a shift in the pattern of histone methylation was observed, with a decreased association with H3mK9 and an increased association with H3mK4 compared with the wild type. We then investigated whether changes in histone H3 methylation were distributed equally through the 5S rDNA regions, with the potential to be transcribed on chromosome 4 and the large locus of chromosome 5 versus non-transcribed regions on chromosome 3. For this purpose, ChIP PCR products from three independent ChIP experiments were sequenced and assigned to the corresponding 5S rDNA loci through the T-stretch signature present downstream of the transcribed region (Table 3) (Cloix et al., 2002). This analysis revealed that 5S rRNA genes from transcribed loci were significantly (Z test, $P = 0.05$) more associated with H3mK9 in the wild type (89.7%) than in *ddm1* (70.8%). By contrast, H3mK4 ChIP-PCR results showed that 5S rDNA from these loci was significantly (Z test, $P = 0.05$) more associated with H3mK4 in *ddm1* (82.5%) than in the wild type (60%). These results indicate that in *ddm1*, more 5S rRNA genes from transcribed loci acquire euchromatin features, in agreement with the presence of larger/more euchromatic 5S rDNA loops in *ddm1*. Thus, in *ddm1*, additional minor 5S rRNA genes, usually present in heterochromatin in the wild type, likely become integrated in the euchromatic 5S rDNA loops that provide a permissive context for transcription.

A higher proportion of 5S rDNA sequences from the units on chromosome 3 were recovered by H3mK9 ChIP in the *ddm1* versus the wild-type background. Reciprocally, a higher proportion of 5S rDNA sequences from chromosome 3 were recovered by H3mK4 ChIP in the wild-type versus the *ddm1* background. Because 5S rDNA loci from chromosome 3 are not transcribed in vivo because of the presence of numerous mutations (Cloix et al., 2002), the ChIP results for this locus cannot be correlated with 5S rDNA expression.

DISCUSSION

In this study, we report that 5S rRNA genes undergo changes in chromatin organization and transcription during leaf development. In leaves, heterochromatin formation at chromocenters

becomes fully established between days 2 and 4 after germination, accompanied by changes in DNA methylation, chromatin organization, and 5S rDNA transcription. At 2 days after germination, the heterochromatin fraction is composed of less-condensed pre-CCs that are much smaller than the CCs observed

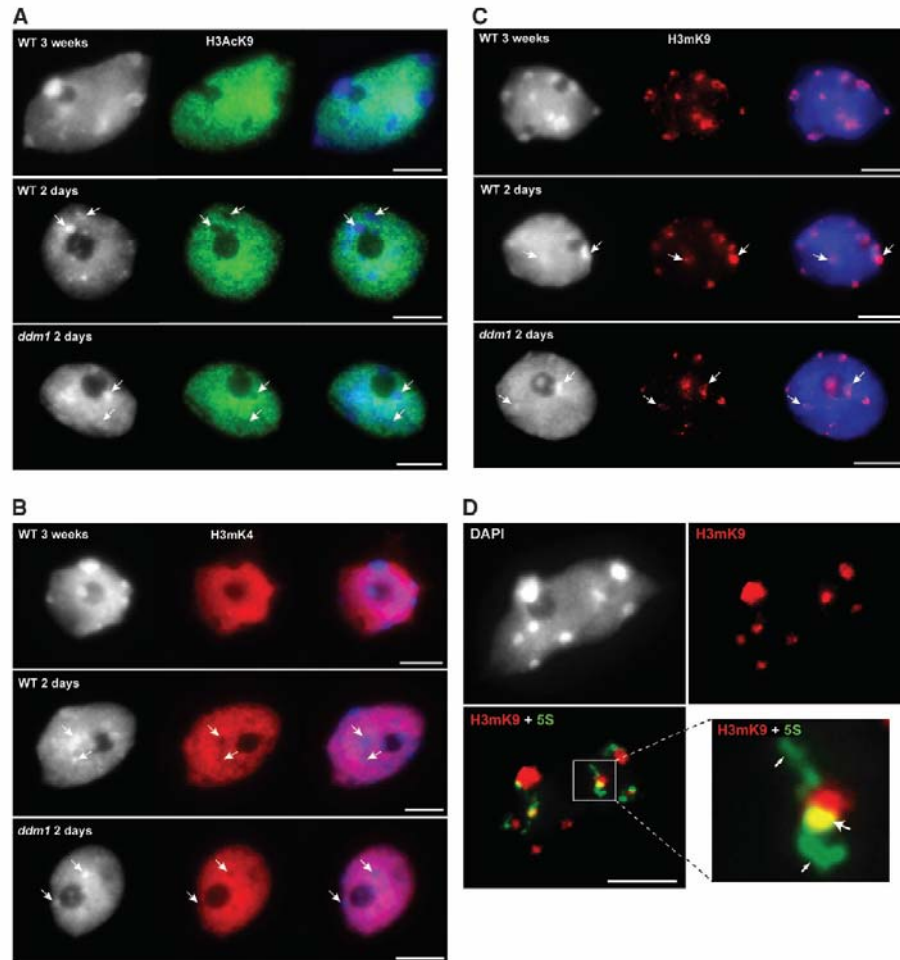


Figure 4. Chromatin Modifications in Nuclei of 2-Day-Old and 3-Week-Old Seedlings and at 5S rDNA Loops.

(A) Histone H3K9 acetylation (green). As in leaf nuclei of 3-week-old plants, heterochromatin of 2-day-old nuclei from both the wild type (WT) and *ddm1* were unlabeled by the H3AcK9 antibody.

(B) Histone H3K4 dimethylation (red). As for H3AcK9, heterochromatin of nuclei from 2-day-old seedlings of the wild type and *ddm1* remained unlabeled, whereas euchromatin showed strong labeling intensity.

(C) Histone H3K9 dimethylation (red). In 2-day-old nuclei from both the wild type and *ddm1* as well as in 3-week-old nuclei, H3mK9 immunosignals localized preferentially to heterochromatin.

In (A) to (C), DAPI staining (left), immunosignals (middle), and the merge of both (right) are shown. Arrows indicate prechromocenters. Bars = 5 μ m.

(D) 5S rDNA loops are devoid of H3K9 dimethylation. H3mK9 labeling of a 3-week-old wild-type nucleus shows strong immunosignals on chromocenters. A merge of the H3mK9 immunosignal (red) and the 5S rDNA FISH signal (green) is shown. The enlargement of a 5S rDNA loop reveals that euchromatic 5S rDNA loops are weakly associated or not associated with dimethylated H3K9 (small arrows), whereas heterochromatic 5S rDNA that associated with dimethylated H3K9 (large arrow) appears yellow (resulting from the superposition of green and red signals). Bar = 5 μ m.

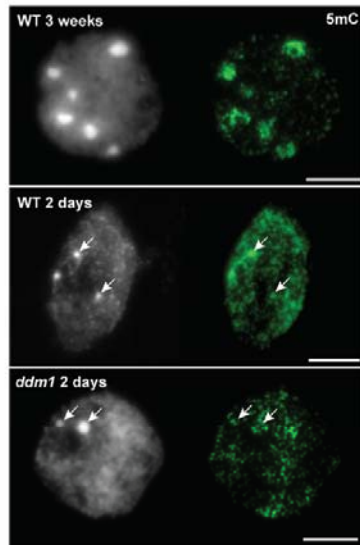


Figure 5. DNA Methylation Pattern in 2-Day-Old Nuclei.

Immunosignals for 5-methylcytosine (5mC; green) are strongly clustered at chromocenters in wild-type (WT) 3-week-old nuclei (top), whereas in *ddm1* 3-week-old nuclei, the immunosignal is dispersed and no longer clustered at chromocenters (not shown; see Soppe et al., 2002). In 2-day-old nuclei from the wild type and *ddm1*, the immunosignals were not clustered at prechromocenters. DAPI staining (left) and immunosignals (right) are shown. Arrows indicate prechromocenters. Bars = 5 μ m.

in 4-day-old and 3-week-old leaf nuclei (Figure 2). This result provides evidence that the appearance of constitutive heterochromatin is dynamic during leaf development in Arabidopsis. Interestingly, there also is a correlation between the formation of pericentric heterochromatin and cell differentiation during mammalian early development (Cammass et al., 2002; Rangasamy et al., 2003).

The chromatin organization of 5S rDNA in 2-day-old nuclei (in roots as well as in cotyledons) is different from that in 3-week-old leaves. 5S rDNA loops are not present and 5S rDNA is undermethylated compared with later stages of development. At 2 days old, major and minor 5S rRNA genes, both located in pre-CCs, are transcribed but produce only 30% as much total rRNA as is detected in mature wild-type leaves. From 4 days on, mostly major 5S rRNA is recovered from leaf nuclei. In adult plant leaf nuclei, the 5S rDNA is found both in condensed CCs and in loops that extend outward from the CCs. The loops show the same H3mK4 and H3AcK9 immunosignals compared with the surrounding euchromatin and no enrichment for 5mC or H3mK9 immunosignals, suggesting that they represent the transcribed fraction of 5S rRNA genes. The silent 5S rDNA presumably resides in condensed CCs. In support of this view, we reported previously that a small proportion of 5S rDNA units have reduced DNA methylation levels (Mathieu et al., 2002b).

These hypomethylated units could correspond to 5S rRNA gene located in the loops. We also reported previously that the *in vitro* transcription of a naked 5S rRNA gene is not impaired by DNA methylation (Mathieu et al., 2002b). Similarly, Santoro and Grummt (2001) reported that the DNA methylation-mediated transcriptional repression of mouse rDNA is efficient on chromatin but not on naked DNA templates. These findings suggest the requirement for a specific chromatin state associated with DNA methylation for the repression of a subset of 5S rRNA genes. Therefore, we propose that between 2 and 4 days after germination, changes in chromatin organization cause major 5S rRNA genes to be incorporated preferentially in 5S rDNA loops and transcribed and cause minor genes to become condensed and repressed.

Demethylation of 5S rDNA by 5-azaC or by the *ddm1* mutation enriches minor 5S rRNA genes expression. The *ddm1* mutation is known to cause a striking decondensation of CCs (Probst et al., 2003). Like other sequences usually located inside CCs (Soppe et al., 2002), a fraction of 5S rDNA is dispersed from CCs, yielding larger 5S rDNA loops than in wild-type nuclei. Because the expression of minor 5S rRNAs is increased in *ddm1* leaves, the minor 5S rRNA genes presumably are included in the larger loops. Consistent with this view, the ChIP data for the transcribed 5S rDNA blocks on chromosomes 4 and 5 show an increased association with H3mK4 and a decreased association with H3mK9 in *ddm1* versus the wild type. The ChIP results for the nontranscribed 5S rDNA units on chromosome 3 present the inverse pattern. A possible explanation

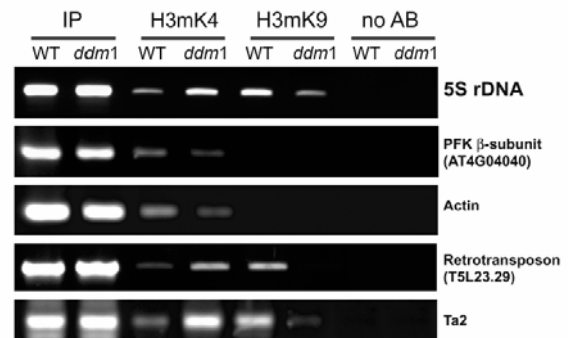


Figure 6. ChIP Analysis of 5S rRNA Genes.

ChIP assays performed on mature plantlets from both wild-type (WT) and *ddm1* plants to analyze the H3K4 or H3K9 dimethylation state of 5S rRNA genes (top gel). A representative image from three independent ChIP experiments is shown. In the wild type, the 5S rDNA is much more associated with H3mK9 than with H3mK4. The association of 5S rDNA with H3mK9 decreases dramatically in *ddm1* compared with the wild type, whereas the association with H3mK4 increases. The phosphofructokinase (PFK) β -subunit gene (At4g04040), the Cinfu-like retrotransposon (T5L23.29), the *ACTIN* gene, and the Ta2 transposon were used as controls with known H3mK4 and H3mK9 patterns. In each case, total chromatin extract (input; IP) and no antibody-precipitated extracts (no AB) are presented.

Table 3. Histone H3 Dimethylation Pattern on 5S rDNA Loci in Wild-Type and *ddm1* Backgrounds

5S rDNA loci	H3mK4		H3mK9	
	Wild type	<i>ddm1</i>	Wild type	<i>ddm1</i>
Chromosome 3 (not transcribed)	40%	17.5%	10.3%	29.2%
Chromosomes 4 and 5 (transcribed)	60%	82.5%	89.7%	70.8%
Total	100%	100%	100%	100%
Number of clones sequenced	40	57	58	48

tion for this pattern is that the histone methylation marks on the nontranscribed loci do not actually vary between *ddm1* and the wild type, but the relative proportions of these loci recovered by ChIP is altered by changes in the recovery of the chromosome 4 and 5 loci. This view is supported by the data of Johnson et al. (2002), who found that in various DNA methylation mutants, nontranscribed sequences retained H3K9 methylation.

5S rDNA transcription revealed quantitative and qualitative differences between organs and developmental stages. The proportion of minor 5S rRNAs showed a negative correlation with DNA methylation but no correlation with the overall 5S rRNA transcript level (Figure 1, Table 1). Instead, the overall level of 5S rRNA transcripts correlated with AtTFIIIA amounts. Because of the unavailability of an AtTFIIIA-specific antibody, we monitored AtTFIIIA mRNA accumulation by semiquantitative RT-PCR and found a good correlation between AtTFIIIA mRNA and 5S rRNA amounts. Although hypomethylated *ddm1* and 5-azaC-treated adult plants transcribe additional minor 5S rRNA genes, they contain the same total quantity of 5S rRNA as untreated wild-type plants. This finding supports the idea that AtTFIIIA is a limiting factor for 5S rDNA transcription.

In conclusion, we have shown that during heterochromatin establishment in Arabidopsis, variations in epigenetic marks at the level of DNA methylation and histone modifications accompany 5S rDNA chromatin organization, resulting in the transcriptional repression of minor 5S rRNA genes. In *ddm1*, heterochromatin does not undergo complete development, yielding smaller mature CCs and resulting in the derepression of minor 5S rRNA gene transcription.

METHODS

Plant Materials

Arabidopsis thaliana wild-type and *ddm1* plants were from the Columbia ecotype. Wild-type seeds (Col-4) were obtained from the ABRC (stock number CS933; Ohio State University, Columbus), and Eric J. Richards (Washington University, St. Louis, MO) provided the seed stock for the *ddm1* mutant. Seeds were grown on a germination medium (MS Salt [Sigma] supplemented with 3% sucrose and 0.8% bacto-agar) for 3 weeks in a growth chamber using a 16-h-light (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)/8-h-dark regime at 23°C. 5-Azacytidine (5-azaC) treatments were performed as described previously (Mathieu et al., 2002b). To obtain postgermina-

tion plantlets, seeds were germinated in water in a growth chamber (16 h of light/8 h of dark) and collected directly at 2 days after germination or transferred on germination medium and collected at 4 days after germination. Roots were removed from 4-day-old plantlets.

Nucleic Acids Isolation and Gel Blot Analysis

Total genomic DNA was isolated from different tissues of 2-day-old and 4-day-old plantlets using the DNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA). Genomic DNA (500 ng) was digested with 20 units of restriction enzyme in the recommended buffer (New England Biolabs, Beverly, MA). Digested DNA was electrophoresed on 0.8% agarose gels overnight, depurinated in 0.25 N HCl, and capillary blotted onto Hybond-N⁺ membranes (Amersham).

Total RNA was extracted according to Logemann et al. (1987) with minor modifications (Mathieu et al., 2002b). For seeds, total RNA was purified according to Vicent and Delseny (1999). For RNA gel blot analysis, 500 ng of total RNA per lane was fractionated on 1% agarose/1.9% formaldehyde gels and capillary blotted onto Hybond-N membranes (Amersham).

DNA probes were labeled with α -³²P-dCTP using a random hexamer priming method (Megaprime DNA labeling system; Amersham). For quantification of the 0.5-kb band intensity, the 0.5-kb band radioactivity (which corresponds to monomeric units of 5S rDNA) was normalized with the whole-line radioactivity (Figure 1A). For the calculation of relative 5S rDNA methylation indicated in Table 2, the ratio obtained in 3-week-old wild-type leaves (used as reference) was divided by the ratio obtained for each sample tested and expressed as a percentage. Quantifications were performed on a phosphorimager (Molecular Imager FX; Bio-Rad).

Reverse Transcription PCR and Sequencing

Total RNA was isolated as described above, and contaminating genomic DNA was removed by DNase I treatment (Roche, Meylan, France) followed by phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) extraction. Reverse transcription reactions were performed in 20 μL with 1 μg of total RNA using 1 μL of Expand reverse transcriptase (Roche) and 2 μL of hexanucleotide mix (for 5S rRNA reverse transcription; Roche) or 25 to 50 pmol of the AtTFIIIA-specific primer AtTFIIIA2 (5'-CTAGCAAGT-TTCGTGTTCTTCTG-3') plus 25 to 50 pmol of the apt2 primer (5'-CCT-TTCCCTTAAGCTCTG-3'), according to the manufacturer's instructions (Roche). Complete removal of the 5S genomic rDNA in the reverse-transcribed samples was controlled by verifying that a PCR step (40 cycles) using primers located in the nontranscribed spacer region of the 5S rRNA genes (5Suniv1, 5'-CTTTTCGGGCNTTTTNGTG-3'; 5Suniv2, 5'-CGAAAGGTATCACATGCC-3') yielded no amplification.

5S cDNA amplification was performed on 50 ng of the cDNA samples using the primers RTPCR5S1 (5'-GGATGCGATCATACCAG-3') and RTPCR5S2 (5'-GAGGGATGCAMCACSAG-3') amplifying the entire transcribed region of the 5S rRNA genes. For AtTFIIIA cDNA amplification, PCR was performed on 350 ng of the cDNA samples with the primers AtTFIIIA4 (5'-CTTACACATAAAGGAAGCTC-3') and AtTFIIIA5 (5'-CCGTAGATGCTCTTGATG-3') spanning the third intron. As an internal control, the APT1 cDNA encoding the adenine phosphoribosyl transferase (Moffatt et al., 1994) was amplified from 150 ng of the cDNA samples with the primers apt1 (5'-TCCCAGAAATCGCTAAGATTGC-3') and apt2 spanning the fourth intron. PCR conditions were as follows: 4 min at 94°C, 20 (APT1) or 30 (AtTFIIIA) cycles of 45 s at 94°C, 1 min at 54°C (AtTFIIIA) or 52°C (APT1), and 90 s at 72°C, and 10 min at 72°C. PCR conditions for 5S cDNAs were 4 min at 94°C, 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 50°C, and 45 s at 72°C, and 5 min at 72°C.

Statistics

Minor 5S rRNA frequencies were compared with Fisher's exact test for a 2×2 contingency table (van Tassel, 1981). The probabilities were calculated from a one-tailed test. Statistical analyses of 5S rDNA methylation and 5S rRNA amounts were performed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test with mean values comparison.

Cytogenetics

For heterochromatin quantification and fluorescent in situ hybridization (FISH) with 5S rDNA and 45S rDNA probes, ethanol:acetic acid (3:1) fixation was used. For immunodetection of modified histones (coupled with 5S rDNA FISH), the tissue was fixed in 4% paraformaldehyde in Tris buffer (10 mM Tris, 10 mM Na₂EDTA, and 100 mM Triton X-100, pH 7.5). Nuclear suspensions were produced as described (Jasencakova et al., 2000, 2001). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

FISH

The following probes were used: Arabidopsis BAC T15P10 (AF167571) containing 45S rDNA repeats labeled with biotin-16-dUTP using the nick translation kit (Roche), and 5S rDNA labeled with digoxigenin-11-dUTP by PCR using gene-specific primers. FISH experiments were performed according to Schubert et al. (2001). When the digoxigenin-labeled 5S rDNA probe was used alone, mouse anti-digoxigenin (1:250; Roche) followed by goat anti-mouse antibody conjugated with biotin (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and avidin conjugated with Texas Red (1:1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA) were used for the detection. When digoxigenin-labeled 5S rDNA and biolabeled 45S rDNA were used together, avidin conjugated with Texas Red (1:1000; Vector Laboratories) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1:200; Vector Laboratories) and avidin-Texas Red (1:1000) were used for the detection of the biotin-labeled probe, and sheep anti-digoxigenin fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:20; Roche) followed by rabbit anti-sheep FITC (1:100; Jackson ImmunoResearch) were used for the detection of the digoxigenin-labeled probe.

Histone and 5-Methylcytosine Immunodetection

The following primary antibodies were used: anti-acetyl-histone H3 (Lys-9), anti-dimethyl-histone H3 (Lys-4), and anti-dimethyl-histone H3 (Lys-9) (1:100; all from Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The immunolabeling procedure for histones was as described (Jasencakova et al., 2000, 2001). After postfixation in 4% paraformaldehyde/PBS, washes in PBS, and blocking at 37°C, the slides were exposed to primary antiserum overnight at 4°C. After washes in PBS, incubation with the secondary antibody anti-rabbit FITC (1:80; Sigma) or anti-rabbit rhodamine (1:100; Jackson ImmunoResearch) was performed at 37°C.

For the combined detection of H3-dimethylK9 and 5S rDNA, immunodetection of histones was performed first. After evaluation and image capture, the slides were processed for subsequent FISH as described previously (Jasencakova et al., 2000, 2001). The detection of 5-methylcytosine was performed using a monoclonal antibody against 5-methylcytidine (1:100; Eurogentec, Seraing, Belgium) in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.5% blocking reagent (Roche), followed by rabbit anti-mouse FITC (1:1000; Sigma) and goat anti-rabbit Alexa-488 (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR). The nuclei were counterstained with DAPI (2 µg/mL in Vectashield; Vector Laboratories).

Microscopy and Image Processing

For microscopic analysis, a Zeiss Axiophot 2 epifluorescence microscope (Jena, Germany) equipped with a cooled charge-coupled device camera (Photometrics, Tucson, AZ) was used. Fluorescence images were captured for each fluorochrome separately through the appropriate excitation filters. The images were pseudocolored, merged, and processed using Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Measuring of Chromocenter Fractions

Digital images in gray scale were analyzed with the freeware program NIH Image 1.62. Special macros were written to measure the size and average staining intensity of nuclei and chromocenters. The chromocenter value was divided by the whole-nucleus value and yielded the chromocenter fraction.

Chromatin Immunoprecipitation Assays

Two-week-old plants (wild type and *ddm1*) were harvested and immersed in 1% formaldehyde under vacuum for 15 min. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed as described (Gendrel et al., 2002; Johnson et al., 2002) using anti-dimethyl-histone H3 (Lys-4) or anti-dimethyl-histone H3 (Lys-9) antibodies (07-030 or 07-212, respectively; Upstate Biotechnology). Each of the immunoprecipitations was performed three independent times.

For ChIP-PCR, the primer pairs used were as follows: for 5S rDNA, RTPCR5S1 (5'-GGATGCGATCATACCAG-3') and 5Suniv2; for the phosphofructokinase β -subunit gene (At4g04040), T24H24.15F (5'-GCCACGAAAACCAAACAGAC-3') and T24H24.15R (5'-CCGGAATTTTCGATCAATCCT-3'); for the Cinfu-like retrotransposon (T5L23.29), T5L23.29F (5'-CTCGATGTCGTATTCGCTGA-3') and T5L23.29R (5'-GCACCTATCAACGCTTCGT-3'); for the *ACTIN* gene, Actin2/7-F (5'-CGTTTCGCTTTCCTTAGTGTAGCT-3') and Actin2/7-R (5'-AGCGAACGGATCTAGAGACTCACCTTG-3'); and for the Ta2 transposon, Ta2-F (5'-AAACGATGCGTTGGGATAGGTC-3') and Ta2-R (5'-ATACTCTCCACTTCCCGTTTTTCTTTTA-3'). PCR was performed on 5 µL of a 1:10 dilution of ChIP samples (At4g04040, T5L23.29, *ACTIN*, and Ta2) or 2 µL of a 1:100 dilution (5S rDNA) in a final volume of 25 µL. PCR conditions were as follows: 5 min at 95°C, 25 (5S rDNA) or 30 cycles (At4g04040, T5L23.29, *ACTIN*, and Ta2) of 45 s at 94°C, 1 min at 54°C (5S rDNA) or 60°C (At4g04040, T5L23.29, *ACTIN*, and Ta2), and 30 s (5S rDNA) or 1 min (At4g04040, T5L23.29, *ACTIN*, and Ta2) at 72°C, and 5 min at 72°C.

Upon request, materials integral to the findings presented in this publication will be made available in a timely manner to all investigators on similar terms for noncommercial research purposes. To obtain materials, please contact Sylvette Tourmente, sylvette.tourmente@univ-bpclermont.fr.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Achim Bruder, Martina Kühne, Nathalie Maroncle, and Claudine Cuvillier for helpful assistance, Armin Meister and Isabelle Jouan for help with statistics and flow cytometry, and Judith Bender and Charles White for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the epigenetic Groupement De Recherche CNRS, and the Université Blaise Pascal. V.C. was supported by Genopole and by a specific fund from the CNRS. Z.J. and I.S. were supported by a grant from the Land Sachsen-Anhalt (3233A/0020T). O.M., I.V., and A.-V.G. were supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Received September 16, 2003; accepted September 26, 2003.

REFERENCES

- Bird, A.P., and Wolffe, A.P. (1999). Methylation-induced repression: Belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451–454.
- Brzeski, J., and Jerzmanowski, A. (2003). Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J. Biol. Chem.* **278**, 823–828.
- Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J.L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P., and Losson, R. (2002). Cell differentiation induces TIF1 β association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J. Cell Sci.* **115**, 3439–3448.
- Campbell, B.R., Song, Y., Posch, T.E., Cullis, C.A., and Town, C.D. (1992). Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **112**, 225–228.
- Cloix, C., Tutois, S., Yukawa, Y., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G., and Tourmente, S. (2002). Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. *Genome Res.* **12**, 132–144.
- Finnegan, E.J., and Kovac, K.A. (2000). Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **43**, 189–201.
- Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T.C., Torres-Ruiz, R.A., and Jones, G. (1998). Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**, 867–876.
- Fransz, P., De Jong, J.H., Lysak, M., Castiglione, M.R., and Schubert, I. (2002). Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14584–14589.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Jordan, C., Colot, V., and Martienssen, R. (2002). Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM1. *Science* **20**, 1871–1873.
- Haaf, T. (1995). The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: Implications for methylation-associated cellular processes. *Pharmacol. Ther.* **65**, 19–46.
- Haizel, T., Merkle, T., Pay, A., Fejes, E., and Nagy, F. (1997). Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *Plant J.* **11**, 93–103.
- Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb. Wiss. Botanik* **69**, 762–818.
- Jasencakova, Z., Meister, A., and Schubert, I. (2001). Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* **110**, 83–92.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B.M., and Schubert, I. (2000). Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *Plant Cell* **12**, 2087–2100.
- Jasencakova, Z., Soppe, W.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M., and Schubert, I. (2003). Histone modifications in *Arabidopsis*: High methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J.* **33**, 471–480.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., and Richards, E.J. (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.* **22**, 94–97.
- Johnson, L., Cao, X., and Jacobsen, S. (2002). Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr. Biol.* **12**, 1360–1367.
- Jones, P.A. (1985). Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell* **40**, 485–486.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 198–209.
- Lachner, M., and Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 286–298.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16–20.
- Mathieu, O., Picard, G., and Tourmente, S. (2002a). Methylation of a euchromatin-heterochromatin transition region in *Arabidopsis thaliana* chromosome 5 left arm. *Chromosome Res.* **10**, 455–466.
- Mathieu, O., Yukawa, Y., Prieto, J.L., Vaillant, I., Sugiura, M., and Tourmente, S. (2003). Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2424–2433.
- Mathieu, O., Yukawa, Y., Sugiura, M., Picard, G., and Tourmente, S. (2002b). 5S rRNA gene expression is not inhibited by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **29**, 313–323.
- Moffatt, B.A., McWhinnie, E.A., Agarwal, S.K., and Schaff, D.A. (1994). The adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **143**, 211–216.
- Murata, M., Heslop-Harrison, J.S., and Motoyoshi, F. (1997). Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence in situ hybridization with cosmid clones. *Plant J.* **12**, 31–37.
- Probst, A.V., Fransz, P.F., Paszkowski, J., and Scheid, O.M. (2003). Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J.* **33**, 743–749.
- Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J.* **22**, 1599–1607.
- Santoro, R., and Grummt, I. (2001). Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol. Cell* **8**, 719–725.
- Schubert, I., Fransz, P.F., Fuchs, J., and de Jong, J.H. (2001). Chromosome painting in plants. *Methods Cell Sci.* **23**, 57–69.
- Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., and Fransz, P.F. (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**, 6549–6559.
- Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836–845.
- van Tassel, D. (1981). BASIC-Pack Statistics for Small Computers. (Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall), pp. 146–151.
- Vicient, C.M., and Delseny, M. (1999). Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Anal. Biochem.* **268**, 412–413.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., and Richards, E.J. (1993). *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* **260**, 1926–1928.
- Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**, 2343–2360.

Article n°3

« MOM1 mediates DNA methylation-independent silencing of repetitive sequences in *Arabidopsis* »

Vaillant, I., Schubert, I., Tourmente, S., Mathieu, O.
EMBO Reports, en révision.

L'article n°2 nous a permis de montrer l'implication de la méthylation ADN dans le contrôle de « silencing » des gènes d'ARNr 5S, notamment par l'étude du mutant *ddm1*. Toutefois, la mutation de *DDM1* a des effets pléiotropiques sur l'organisation de la chromatine et sur différentes marques épigénétiques. Afin d'affiner notre compréhension des mécanismes épigénétiques régulant l'expression des gènes d'ARNr 5S, nous avons choisi de mener une étude dans des plantes mutantes pour les ADN méthyltransférases MET1 et/ou CMT3. De plus, nous avons inclus une étude de l'expression des gènes d'ARNr 5S dans des plantes mutantes pour la protéine MOM1. MOM1 est une protéine appartenant à un mécanisme de « silencing » indépendant de la méthylation ADN (Amedeo et al., 2000; Mittelsten Scheid et al., 2002; Probst et al., 2003; Steimer et al., 2000). Il nous paraissait intéressant de savoir si MOM1 participe au « silencing » des gènes d'ARNr 5S puisque la seule cible endogène de MOM1 identifiée jusque là sont les séquences *TSI*.

Nous avons pu montrer que les gènes d'ARNr 5S sont soumis à une voie de « silencing » dépendante de la méthylation ADN (la méthylation CG ayant un rôle majoritaire dans ce « silencing »), et à une voie de « silencing » indépendante de la méthylation ADN impliquant MOM1. De plus, nous montrons que la mutation de *MOM1* induit une levée de « silencing » sans affecter la méthylation ADN, et également sans affecter différentes méthylations de l'histone H3 portées par les gènes d'ADNr 5S. MOM1 agit donc indépendamment de la méthylation ADN et de la méthylation histone. Nous avons étendu notre étude à d'autres séquences localisées au niveau des chromocentres, ainsi qu'à différents éléments transposables. Nos résultats démontrent que MOM1 cible les séquences hétérochromatiques méthylées hautement répétées (ADNr 5S, répétitions 106B, et répétitions centromériques 180 pb), et n'agit pas sur la répression des éléments transposables, quelque soit leur localisation génomique. Les éléments transposables semblent être ciblés uniquement par la voie de « silencing » dépendante de la méthylation, avec MET1 comme acteur principal.

MOM1 mediates DNA methylation-independent silencing of repetitive sequences in *Arabidopsis*

Isabelle Vaillant¹, Ingo Schubert², Sylvette Tourmente¹ and Olivier Mathieu^{1*}

¹UMR CNRS 6547, BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.

²Department of Cytogenetics, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany.

*To whom correspondence should be addressed: Tel: (+33) 4 73 40 77 31; FAX: (+33) 4 73 40 77 77; e-mail: olivier.mathieu@univ-bpclermont.fr

Total character count: 27,349

Running title: MOM1-mediated silencing of *Arabidopsis* repeats

Keywords: 5S genes; Centromeric repeats; DNA methylation; MOM1; Silent chromatin

Abstract

The heterochromatic regions around centromeres of animal and plant chromosomes are composed of tandem repetitive sequences, interspersed with transposons and transposon-derivatives. These sequences are largely transcriptionally silent, highly methylated and associated with specifically modified histones. Although embedded in heterochromatin, *Arabidopsis* 5S rRNA genes are among the most highly transcribed genes. However, some 5S genes are silenced and we show here that this silencing can be suppressed by a reduction in CG methylation. Importantly, we show that mutation of *MOM1* releases 5S repeat-silencing independently of chromatin properties as illustrated by the absence of detectable alteration of DNA and histone H3 methylation patterns. *MOM1* prevents also transcription of 180-bp satellite repeats and *106B* dispersed repeats but not of transposons. Our results provide evidence that transcription of densely methylated and highly repetitive heterochromatic sequences is controlled by two distinct epigenetic silencing pathways, one dependent on, and one independent of DNA methylation.

Introduction

Except for the nucleolus organizing regions, the heterochromatin of *Arabidopsis* is clustered around centromeres in strongly DAPI-stained chromocenters and predominantly composed of tandem repeat arrays interspersed with transposable elements and their truncated derivatives. The sequences of these chromocenters are mostly transcriptionally silent and distinct patterns of covalent modifications affecting both DNA and histone proteins are associated with this repressive chromatin environment (reviewed in Fuchs et al., 2006).

In plants, DNA methylation patterns at CG sites are maintained by the mammalian Dnmt1-orthologue *MET1* (METHYLTRANSFERASE1), while *CMT3* (CHROMOMETHYLASE3) is the major methyltransferase that maintains non-CG methylation at transposable elements and centromeric repeats (Bartee et al., 2001; Finnegan and Kovac, 2000; Lindroth et al., 2001; Lippman et al., 2003; Tompa et al., 2002; Tran et al., 2005). Plants deficient in *MET1* and *CMT3* show a release of silencing from loci located in chromocenters (Johnson et al., 2002; Lippman et al., 2003; May et al., 2005; Steimer et al., 2000). Mutation of *DDM1* (DECREASE IN DNA METHYLATION1), a putative SWI/SNF2-like chromatin-remodeling factor, also causes reduced DNA methylation and release of silencing at chromocenter sequences (Hirochika et al., 2000; Johnson et al., 2002; Lippman et al., 2003; May et al., 2005; Singer et al., 2001; Steimer et al., 2000). Previous studies have identified *MOM1* (Morpheus' Molecule1) as a component of a silencing

mechanism independent of DNA methylation marks (Amedeo et al., 2000; Mittelsten Scheid et al., 2002; Probst et al., 2003; Steimer et al., 2000). In contrast to *ddm1*, *mom1* releases silencing of *TSI* (*Transcriptionally Silent Information*) repeats at chromocenters without altering their DNA methylation status (Steimer et al., 2000). No endogenous targets of MOM1 other than *TSI* have thus far been identified.

The tandemly-repeated 5S rRNA genes are exceptional chromocenter sequences due to their high transcriptional activity and understanding regulation of 5S gene expression in its heterochromatic environment is of particular interest. Although the majority of 5S genes are actively transcribed, some 5S genes are silenced in wild-type (WT) plants (Mathieu et al., 2003). We show here that silencing of 5S repeats is controlled by DNA methylation-dependent and by MOM1-mediated, DNA methylation-independent mechanisms. The same is true for the centromeric 180-bp satellite and *106B* repeats but not for transposable elements, which seem not to be targeted by MOM1, irrespective of element type and genomic position. In conclusion, our results show that the MOM1-mediated, DNA methylation-independent pathway, contributes to silencing of highly repetitive sequences.

Results and Discussion

We previously described the existence of 5S genes that are silenced in WT plants that we named minor 5S genes (Mathieu et al., 2003). Mutations in *DDM1* release silencing of these, producing transcripts differing from the major 5S rRNA sequence by one or two base substitutions (Mathieu et al., 2003). However, because of the indirect effect of *ddm1* on DNA methylation, it remains unclear whether *ddm1*-induced release of silencing is mediated by loss of DNA methylation or by accompanying changes in chromatin structure. Here we directly investigated 5S gene silencing in plants carrying mutations in the DNA methyltransferases MET1 and CMT3.

In order to rapidly detect the release of 5S repeat silencing, we designed 5S-specific primer pairs that cover the entire 5S repeat sequence and used these in RT-PCR experiments. One primer pair detected low levels of 5S transcripts of 140 and 210 nucleotides (nt) in WT Columbia plants (Fig 1A and B). Both 5S transcripts accumulated to a higher level in *ddm1* than in WT plants and were named 5S-140 and 5S-210, respectively. In WT plants of Landsberg *erecta* and Zürich ecotypes, only 5S-210 transcripts accumulated at low levels, showing that the presence of 5S-140 transcripts is polymorphic between *Arabidopsis* ecotypes (Fig 1B). Sequencing of RT-PCR products from WT Columbia and *ddm1* plants revealed that the 5S-210 transcripts only originate from the transcriptionally

active 5S-repeat clusters located on chromosomes 4 and 5 (Supplementary Fig 1). Importantly, similar to minor 5S rRNAs, the sequence of the 5S-210 transcripts was heterogeneous specifically in *ddm1* and frequently displayed one or two nucleotide substitutions compared with the major 5S rRNA sequence (Supplementary Fig 1). The 5S-140 transcript differed from the 5S-210 transcripts by a 70-nt deletion and likely originates from shorter 5S repeats present only in Columbia. The presence of high level of 5S-210 transcript in *ddm1* relative to wild-type plants correlates with the release of silencing of minor 5S genes in this mutant (Mathieu et al., 2003). Therefore, rather than sequencing numerous 5S RT-PCR products to detect the presence of minor 5S RNAs, we used the accumulation of 5S-210 transcripts as a marker of silencing release at 5S genes.

5S-210 transcripts overaccumulated in *met1* but not in *cmt3* (Fig 1B). DNA gel blot analysis of genomic DNA after digestion with *HpaII* (inhibited by the methylation of either C in the sequence CCGG) and *MspI* (inhibited by methylation of the outer C in the non-CG context CCGG) showed that *met1* mutation strongly decreased CG methylation at 5S genes, and to a lesser extent non-CG methylation; whereas *cmt3* specifically reduced non-CG methylation (Fig 1C). The release of 5S gene-silencing in *met1* but not in *cmt3* refines our previous conclusions from *ddm1* analysis, indicating that silencing of 5S genes is controlled by MET1-mediated CG methylation whereas non-CG methylation has little or no influence. Surprisingly, as confirmed by real-time RT-PCR, the *met1 cmt3* double mutant releases 5S gene silencing to a lesser extent than *met1* alone, although DNA methylation was strongly reduced at both CGs and non-CGs contexts (Fig 1B and C; see below).

MOM1 is part of a silencing pathway that acts independently of DNA methylation (Amedeo et al., 2000). We assessed whether this silencing mechanism also operates on 5S genes. The 5S-210 transcript level was higher in *mom1* than in WT plants although the dense cytosine methylation of the 5S genes remained unaffected (Fig 1B and C). The impact of *mom1* on 5S gene silencing was further confirmed by the high proportion of minor 5S rRNA transcripts accumulating in *mom1* plants than in WT (Fig 1D). Importantly, chromatin immunoprecipitation analysis revealed that the distribution of heterochromatin-specific (H3K9me2, H3K27me2) and euchromatin-specific (H3K4me2, H3K27me3) histone H3 marks at 5S rDNA was not modified in *mom1* plants in spite of the release of silencing (Fig 1E). The antibodies reacted as expected with the control sequences for heterochromatin (*Ta2*) and euchromatin (*PFK-β* and *TUBULIN8*) (Fig 1E). These results contrast with the drastic changes in histone H3 methylation patterns reported in *met1* and *ddm1* for several heterochromatic sequences, including 5S rDNA (Gendrel et al., 2002; Mathieu et al., 2003;

Mathieu et al., 2005; Tariq et al., 2003). Moreover, nuclear architecture is altered in these two mutants whereas *mom1* nuclei exhibit a WT morphology (Probst et al., 2003; Soppe et al., 2002). Together, this suggests that *mom1* alleviates silencing of 5S genes without altering chromatin properties. These results indicate that in addition to a methylation-dependent silencing pathway involving *MET1*, 5S genes are also subjected to a MOM1-mediated silencing mechanism that acts independently of DNA and histone H3 methylation.

The unanticipated weak release of 5S gene silencing in *met1 cmt3* compared with *met1* plants motivated us to investigate the expression of *TSI*, another MOM1 target, in the *met1 cmt3* double mutant background. DNA gel blot analysis revealed that DNA methylation at *TSI* and 5S genes is identically affected by *met1*, *cmt3* and *met1 cmt3* (Fig 1C and Supplementary Fig 2). *TSI* transcripts of high molecular weight accumulated in *met1*, showing that *TSI* silencing is strongly released due to the loss of MET1 (Fig 2A). No *TSI* transcripts were detectable in *cmt3* suggesting that, similar to 5S genes, a reduction in non-CG methylation is not sufficient to strongly alleviate silencing of *TSI*. However, in contrast to the situation observed for 5S genes, the *TSI* transcript levels were higher in *met1 cmt3* than in either single mutant indicating a synergistic effect of the mutations on release of silencing at these repeats. This result suggests that CMT3-mediated non-CG methylation at *TSI* provides an additional epigenetic mark that reinforces MET1-mediated CG methylation and gene silencing.

In addition to the 5S genes and *TSI*, chromocenters contain large assemblies of 180-bp satellite repeats interspersed with *106B* LTR-like dispersed repeats (Fransz et al., 1998; Thompson et al., 1996). Therefore, we investigated silencing at *106B* and 180-bp repeats in the *met1*, *cmt3*, *met1 cmt3* and *mom1* backgrounds. In agreement with previous data (May et al., 2005), RT-PCR assays detected a low level of *106B* transcripts in WT plants that was strongly up-regulated in *met1* (Fig 2B). *106B* transcripts accumulated at similarly high levels in *met1* and in *met1 cmt3* backgrounds as confirmed by real-time RT-PCR whereas the *cmt3* mutant showed no increase in *106B* transcripts, in spite of a decrease in non-CG methylation (Fig 2B and Supplementary Fig 2). This suggests that, similar to 5S genes, silencing of *106B* repeats is mainly under the control of MET1-mediated CG methylation. RT-PCR with *mom1* RNA as a template revealed up-regulation of *106B* transcription relative to WT levels (Fig 2B), without detectable alteration of DNA methylation patterns (Supplementary Fig 2). Thus, *106B* repeats are also subjected to MOM1-mediated, methylation-independent silencing.

Elevated levels of 180-bp repeat transcript were also detected in *met1* and to a lesser extent in *cmt3*, confirming previous data (Fig 2C; May et al., 2005). Consistent with the impact of *cmt3*, we observed a synergistic effect of *met1* and *cmt3* mutations on 180-bp repeat transcription as evidenced by the presence of transcripts of intermediate size in the *met1 cmt3* double mutant. In this respect, 180-bp repeats resemble *TSI* with CMT3-mediated non-CG methylation and MET1-mediated CG methylation cooperating to establish full transcriptional silencing. Importantly, *mom1* also increases levels of 180-bp repeat transcripts (Fig 2C) without detectable modification of DNA methylation status (Supplementary Fig 2), showing that MOM1 controls silencing of 180-bp repeats.

Chromocenters are enriched in transposable elements in addition to 5S genes, 180-bp satellite repeats, *106B* dispersed repeats and *TSI*. RT-PCR confirmed that two of these, the *Ta3* and *Athila* retroelements, were not reactivated in *mom1* plants (Fig 3), suggesting that LTR-retrotransposons are not generally targeted by MOM1 (Steimer et al., 2000). Furthermore, we tested transcription of other transposable elements: two *Mutator*-like DNA transposons located either at chromocenters (*MULE* At1g40097) or in a euchromatic environment (*MULE* At1g43280), the short interspersed nuclear element (SINE) *AtSN1* and the SINE-derived tandem repeats located upstream of the *FWA* gene (*FWAtr*), the latter both residing within euchromatin. All but *MULE* At1g40097 were reactivated in *met1* background (Fig 3), illustrating that CG methylation suppresses transcription of diverse types of transposable elements. Transcripts corresponding to *MULE* At1g40097 were only detected in *met1 cmt3*, and among all analyzed transposons, only *Ta3* and *AtSN1* transcripts were more abundant in *met1 cmt3* than in single mutant backgrounds (Fig 3). Since transposable elements of all types are predominant targets of CMT3 (Tran et al., 2005), it is likely that non-CG methylation at *MULE* At1g43280, *Athila* and *FWAtr* is also maintained by CMT3. In contrast to methylation of CG dinucleotides, these observations indicate that CMT3-mediated non-CG methylation does not equally influence silencing of all transposable elements. Importantly, none of the transposable elements assessed in the present study were reactivated in *mom1* (Fig 3). Therefore, we conclude that transposable elements are not targeted by MOM1 for silencing, irrespective of their nature and genomic location. This further shows that MOM1 affects silencing at fewer loci than DNA methylation.

Among the targets analyzed in the present study, the 5S genes were the only target for which silencing release in *met1 cmt3* was weaker than in the *met1* single mutant (Fig 1B). Southern blot analysis indicated that the *MOM1* genomic sequence surrounding the

promoter region is methylated in WT plants and loses some CG and non-CG methylation in *met1* and *met1 cmt3* and non-CG methylation in *cmt3* (Fig 4A and B). RT-PCR and RNA gel blot analyses revealed that the *MOM1* transcript was slightly up-regulated in *cmt3* and *met1 cmt3* but not in *met1* (Fig 4C and D), suggesting that *MOM1* transcription is influenced by non-CG methylation. Interestingly, this suggests that the *MOM1*-mediated silencing pathway is itself under the influence of DNA methylation, though *MOM1* acts on its targets independently of DNA methylation. Given that *MOM1* participates in the control of 5S gene silencing, we hypothesize that the up-regulation of *MOM1* in *met1 cmt3* might counteract the anticipated release of silencing induced by *met1* at 5S genes in the *met1 cmt3* double mutant. This implies that 5S genes exhibit some yet unknown specific features with respect to the other *MOM1* targets.

Transposable elements appear to be targeted only by a methylation-dependent silencing mechanism in which *MET1* is the major player. Although *CMT3* preferentially targets transposable elements (Tompá et al., 2002; Tran et al., 2005), our results suggest that non-CG methylation does not equally influence silencing of all transposons. Further studies are needed to clarify this issue. On the other hand, our data broaden the spectrum of *MOM1* action and highlight that both methylation-dependent and *MOM1* methylation-independent silencing pathways cooperate to silence densely-methylated and highly-repetitive heterochromatic sequences. As a next step, it will be important to identify additional components of the *MOM1*-mediated silencing pathway in order to gain new insights into *MOM1* target specificity and mode of action.

Methods

Plant material

Plants were grown in soil in a greenhouse with an 18h photoperiod at 22°C. *ddm1-2* (Vongs et al., 1993) is in Columbia background, *met1-1*, *cmt3-7* (Lindroth et al., 2001) and *met1-1 cmt3-7* (Johnson et al., 2002) strains are in Landsberg *erecta* background, and *mom1-1* (Amedeo et al., 2000) is in Zürich background.

Gel blot analysis

DNA gel blot analyses were performed as described previously (Mathieu et al., 2003). Total RNA was extracted from leaf tissue using TRI-reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. For *TSI* RNA gel blot analysis, 10 µg of total RNA per lane was

used; for *MOM1* transcript analysis, we used 2-5 µg of polyA⁺ RNA per lane. The different probes used are described in the supplementary information.

Chromatin immunoprecipitation

ChIP was performed as described previously (Mathieu et al., 2005). The histone-DNA complexes were precipitated with antibodies against dimethyl H3K9, dimethyl H3K27, trimethyl H3K27 (Perez-Burgos et al., 2004) or dimethyl H3K4 (Upstate Biotechnology). ChIP-PCR conditions are described in the supplementary information.

RT-PCR analysis

Aliquots of 3 µg of total RNA were treated with the RQ1-DNase (Promega) and 100 ng DNase-treated total RNA was used as input in semi-quantitative RT-PCR reactions using the OneStep RT-PCR kit (Qiagen). Controls were performed without reverse transcriptase to detect contaminating DNA. Amplification of *ACTIN2* RNA was used as an internal control. Conditions for PCR and real-time RT-PCR are described in the supplementary information.

Supplementary information is available at *EMBO reports* online.

Acknowledgments

We thank Steven E. Jacobsen for *met1-1*, *cmt3-7* and *met1-1 cmt3-7*; Ortrun Mittelsten Scheid for *mom1-1* seeds; Thomas Jenuwein for providing antibodies and Michelle Ebbs and Charles White for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS, the Université Blaise Pascal and a grant from the French Ministry of Research (ACI BCMS #04-5486). I.V. was supported by a graduate studentship from the French Ministry of Research.

References

- Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Mittelsten Scheid, O. and Paszkowski, J. (2000) Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature*, **405**, 203-206.
- Bartee, L., Malagnac, F. and Bender, J. (2001) Arabidopsis *cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev*, **15**, 1753-1758.

- Finnegan, E.J. and Kovac, K.A. (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol*, **43**, 189-201.
- Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T.C., Torres-Ruiz, R.A. and Jones, G. (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **13**, 867-876.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A. and Schubert, I. (2006) Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends Plant Sci*, **11**, 199-208.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V. and Martienssen, R.A. (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM1. *Science*, **297**, 1871-1873.
- Hirochika, H., Okamoto, H. and Kakutani, T. (2000) Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell*, **12**, 357-369.
- Johnson, L., Cao, X. and Jacobsen, S. (2002) Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol*, **12**, 1360-1367.
- Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. and Jacobsen, S.E. (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, **292**, 2077-2080.
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T. and Martienssen, R. (2003) Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol*, **1**, E67.
- Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I. and Tourmente, S. (2003) Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**, 2929-2939.
- Mathieu, O., Probst, A.V. and Paszkowski, J. (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. *EMBO J*, **24**, 2783-2791.
- May, B.P., Lippman, Z.B., Fang, Y., Spector, D.L. and Martienssen, R.A. (2005) Differential Regulation of Strand-Specific Transcripts from *Arabidopsis* Centromeric Satellite Repeats. *PLoS Genet*, **1**, e79.
- Mittelsten Scheid, O., Probst, A.V., Afsar, K. and Paszkowski, J. (2002) Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13659-13662.

- Perez-Burgos, L., Peters, A.H., Opravil, S., Kauer, M., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2004) Generation and characterization of methyl-lysine histone antibodies. *Methods Enzymol*, **376**, 234-254.
- Probst, A.V., Fransz, P.F., Paszkowski, J. and Mittelsten Scheid, O. (2003) Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J*, **33**, 743-749.
- Singer, T., Yordan, C. and Martienssen, R.A. (2001) Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene Decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev*, **15**, 591-602.
- Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I. and Fransz, P.F. (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J*, **21**, 6549-6559.
- Steimer, A., Amedeo, P., Afsar, K., Fransz, P., Mittelsten Scheid, O. and Paszkowski, J. (2000) Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 1165-1178.
- Tariq, M., Saze, H., Probst, A.V., Lichota, J., Habu, Y. and Paszkowski, J. (2003) Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8823-8827.
- Thompson, H.L., Schmidt, R. and Dean, C. (1996) Identification and distribution of seven classes of middle-repetitive DNA in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3017-3022.
- Tompa, R., McCallum, C.M., Delrow, J., Henikoff, J.G., van Steensel, B. and Henikoff, S. (2002) Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol*, **12**, 65-68.
- Tran, R.K., Zilberman, D., de Bustos, C., Ditt, R.F., Henikoff, J.G., Lindroth, A.M., Delrow, J., Boyle, T., Kwong, S., Bryson, T.D., Jacobsen, S.E. and Henikoff, S. (2005) Chromatin and siRNA pathways cooperate to maintain DNA methylation of small transposable elements in *Arabidopsis*. *Genome Biol*, **6**, R90.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A. and Richards, E.J. (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science*, **260**, 1926-1928.

Legends to figures

Fig 1. Release of 5S gene silencing in silencing-deficient mutants.

(A) A scheme of a 5S repeat showing the position of the primers used in (B) and (D) and the regions being amplified. The region corresponding to 5S rRNA is represented by a black box. The dotted line indicates the 70-nt deletion in 5S-140 relative to 5S-210.

(B) RT-PCR detection of 5S-210 and 5S-140 transcripts. Amplification of *ACTIN2* was used to normalize the amounts of RNA template. Negative controls lack reverse transcriptase (no RT). Numbers below the gel indicate the relative RNA levels (R.T.L.) of the 5S-210 transcript in *met1 cmt3* relative to *met1* as determined by real-time RT-PCR. *met1-1*, *cmt3-7* and *met1-1 cmt3-7* are in the Landsberg *erecta* (*Ler*) background. *ddm1-2* and *mom1-1* mutations are in the Columbia (Col) and Zürich (Zh) backgrounds, respectively. WT, wild-type.

(C) DNA methylation of 5S genes. Genomic DNA was purified from leaves of three-week-old plants of the indicated genotype, digested with *HpaII* or *MspI* and probed with a 5S probe on DNA gel-blots.

(D) Proportion of minor 5S rRNAs recovered in *mom1-1* and *ddm1-2* (Mathieu et al., 2003) backgrounds. Asterisks denote significant differences to the WT values ($P < 0.05$; Fisher's exact test).

(E) ChIP analysis of 5S rDNA using antibodies against H3K9me2 and H3K27me2, specific for heterochromatin, and against H3K4me2 and H3K27me3, specific for euchromatin. A heterochromatin control (the *Ta2* retrotransposon) and controls for euchromatin (the phosphofructokinase β -subunit (*PFK- β*) and the *TUBULIN8* (*TUB8*) genes) are presented. Representative gel pictures of three independent replicates are shown.

Fig 2. Mutation of *MOM1* reactivates transcription of chromocenter repeats

(A) *TSI* transcript accumulation was analyzed by RNA gel-blot analysis using *TSI-A15* probe (Upper). The same blot was hybridized with a *RAN* probe as a loading control (bottom).

Transcriptional analysis of the *106B* LTR-like repeats (B) and of the 180-bp satellite repeats (C) was performed by semi-quantitative RT-PCR. Numbers below the gel in (B) indicate the relative RNA levels (R.T.L.) of *106B* transcripts in *met1 cmt3* relative to *met1* and were determined by real-time RT-PCR. Expression of *ACTIN2* was used to normalize the amounts of RNA template. Negative controls were performed without reverse transcriptase (no RT). The size of the amplicons is indicated on the right. Asterisks in (C) mark the

position of transcripts of intermediate size in *met1 cmt3*. WT, wild-type; *Ler*, Landsberg *erecta*; Zh, Zürich.

Fig 3. Transcriptional analysis of various transposons.

Semi-quantitative RT-PCR was performed as described in Methods. Expression of *ACTIN2* was used to normalize the amounts of RNA template. Negative controls lacked reverse transcriptase (no RT). The size of the amplicons is indicated on the right. WT, wild-type; *Ler*, Landsberg *erecta*; Zh, Zürich.

Fig 4. Non-CG methylation influences *MOM1* transcription.

(A) A schematic representation of the genomic region surrounding the *MOM1*-gene transcription start site (hooked arrow). Recognition sites for the restriction enzymes are indicated with their position relative to the outermost *NsiI* site. The region used as a probe in (B) is shown. N, *NsiI*; H, *HpaII*; S, *ScrFI*.

(B) DNA Methylation analysis of *MOM1* promoter region. Genomic DNA of the indicated genotypes was digested with *NsiI* (methylation insensitive) followed by a secondary digestion with methylation sensitive restriction endonucleases. The DNA gel-blot was probed with a region surrounding the *MOM1* transcription start site. *MspI* and *ScrFI* report on non-CG methylation, whereas *HpaII* is sensitive to both CG and non-CG methylation. Position of size markers is indicated on the right.

(C) Transcriptional analysis of *MOM1* by semi-quantitative RT-PCR. Negative controls lacked reverse transcriptase (no RT). The size of the amplicons is indicated on the right. Expression of *ACTIN2* was used to normalize the amounts of RNA template.

(D) Northern blot analysis of *MOM1* transcript. The same blot was hybridized with a *RAN* probe as a loading control (bottom). Quantifications of the *MOM1* transcript signal were performed on a phosphorimager (Molecular Imager FX; Bio-Rad) and are indicated below the RNA blot. WT, wild-type; *Ler*, Landsberg *erecta*; Zh, Zürich.

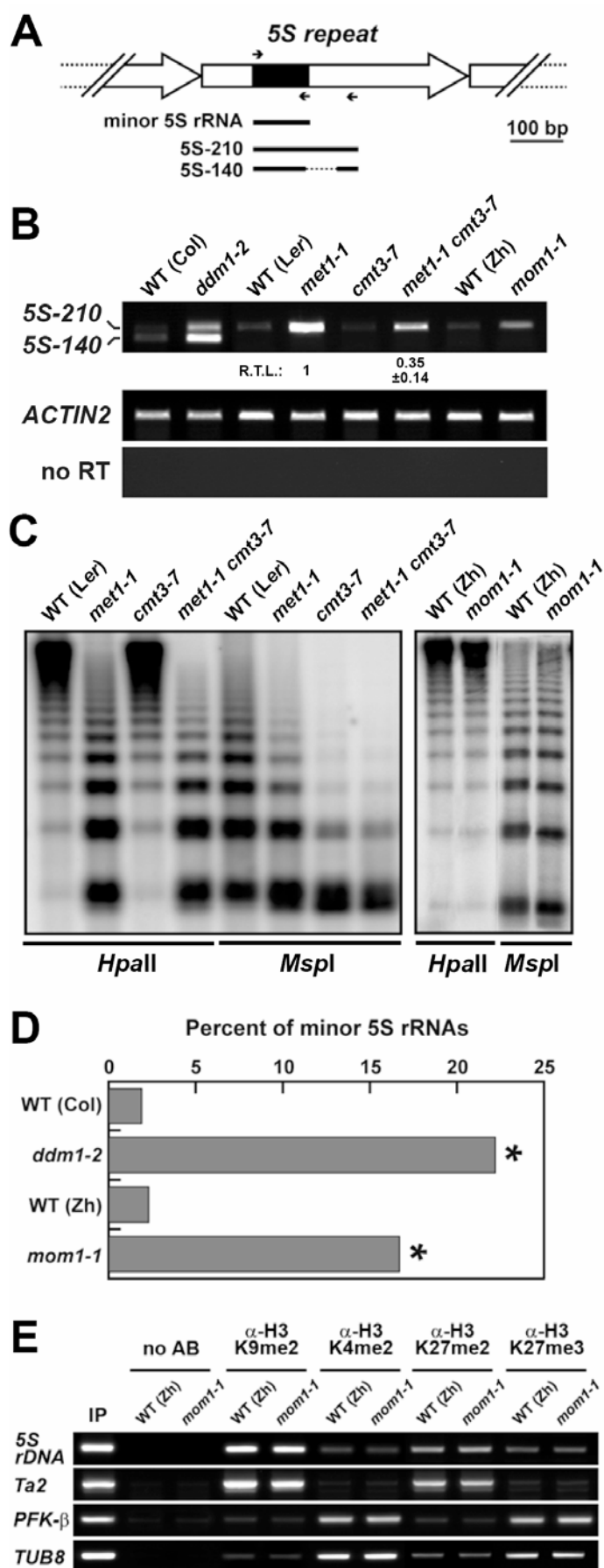


Fig 1. Vaillant et al.

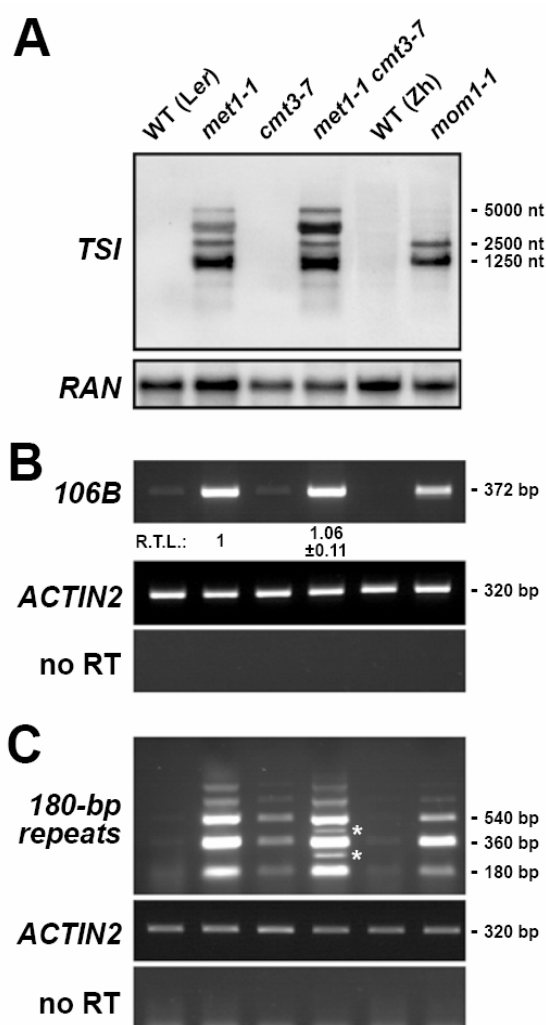


Fig 2. Vaillant et al.

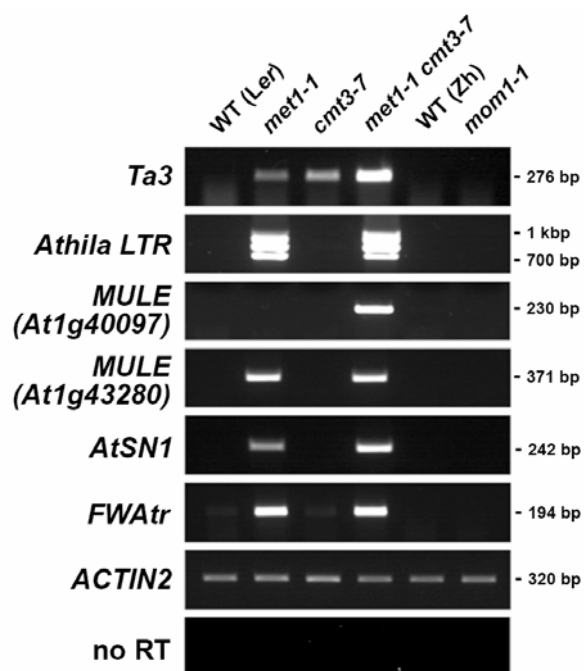


Fig 3. Vaillant et al.

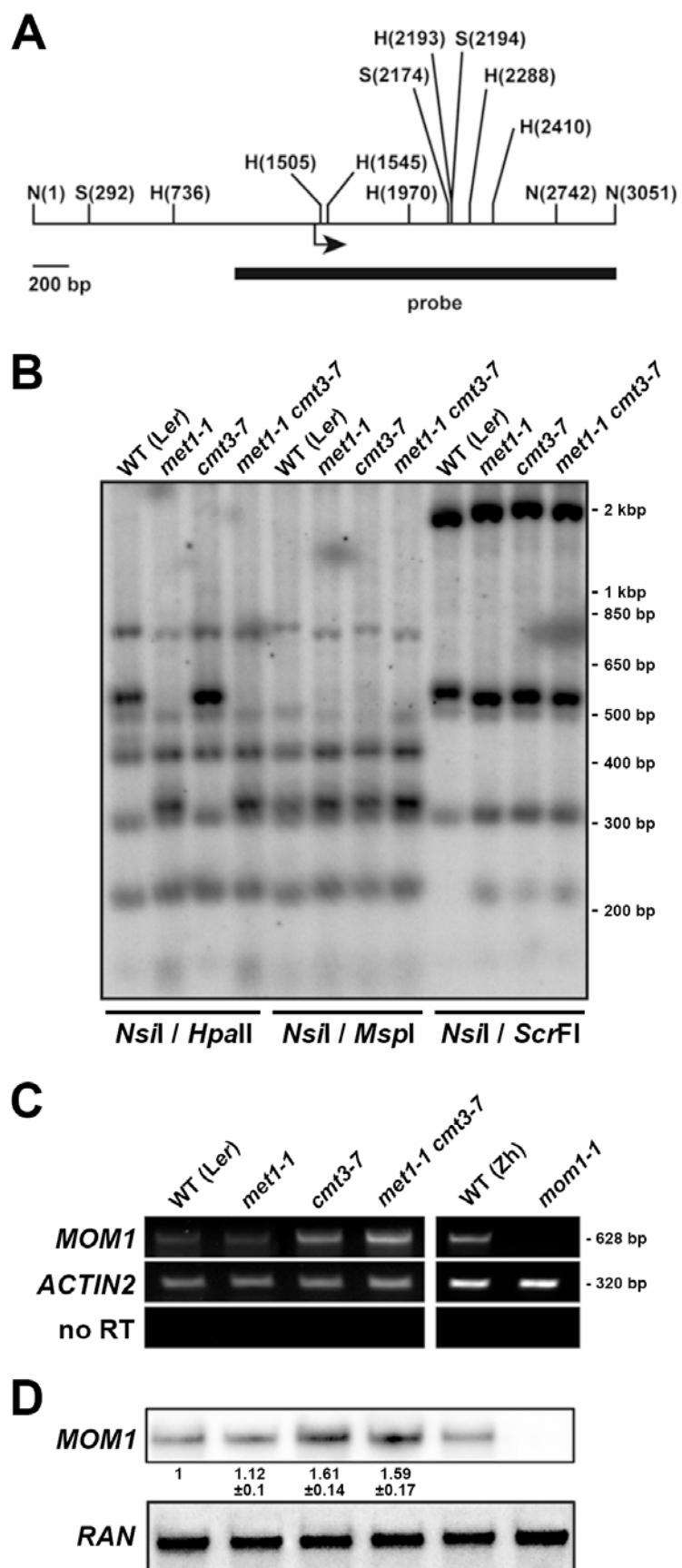


Fig 4. Vaillant et al.

Supplementary Information

(Supplementary Methods, Supplementary Table 1, Legends to Supplementary Figures 1 and 2, References, Supplementary Figure 1, Supplementary Figure 2)

MOM1 mediates DNA methylation-independent silencing of repetitive sequences in *Arabidopsis*

Isabelle Vaillant¹, Ingo Schubert², Sylvette Tourmente¹ and Olivier Mathieu^{1*}

¹UMR CNRS 6547, BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.

²Department of Cytogenetics, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany.

Supplementary Methods

Probes used in gel blot analyses

We amplified the probes to detect 5S rDNA and *106B* repeats by PCR from genomic DNA using 5S-F and 5S-R primers (Kanno et al., 2005) and 106B-F and 106B-R, respectively. Probes to detect 180-bp repeats, *TSI* and *RAN* (for RAS-related nuclear protein; Haizel et al., 1997) were amplified from plasmids carrying two tandemly-repeated 180-bp repeats, *TSI*-A15 and *RAN* fragments, respectively. Probe to detect *MOM1* promoter region was amplified from genomic DNA using primers MOM1-F and MOM1-R; and probe to detect *MOM1* transcript was amplified from cDNA using CD29-F and CLA3-R (Tariq et al., 2002). Probes were labeled with [α -³²P]dCTP using random hexamer priming (Megaprime DNA labeling system; Amersham).

Chromatin immunoprecipitation PCR conditions

Following chromatin immunoprecipitation with the appropriate antibodies, 5S rDNA, Ta2 (a heterochromatin control), the phosphofructokinase β -subunit gene At4g04040 and *TUBULIN* 8 (euchromatin controls) were amplified using primers listed in supplementary table 1 in a 20 μ l PCR reaction, starting with 5 min at 95°C and followed by 21-40 (depending on the region being amplified) cycles of 95°C, 60°C (54°C for 5S rDNA) and

72°C (30 s each) with a final elongation of 5 min at 72°C. PCR products were resolved on a 3% agarose gel.

Semi-quantitative RT-PCR conditions

PCR conditions using gene-specific primers were as follow:

5S-210 and *5S-140* transcripts were amplified using RTPCR5S1 and 5SUNIV2 primers for 33 cycles (94°C for 45 s, 51°C for 45 s, 72°C for 30 s);

Ta3 was amplified using primers Ta3 middle-F and Ta3-middle-R (Johnson et al., 2002) for 35 cycles (94°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 1 min);

MULE At1g43280 was amplified using primers At1g43280-F and At1g43280-R for 35 cycles (94°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 1 min);

106B was amplified using primers 106B-F and 106B-R (May et al., 2005) for 35 cycles (94°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 1 min);

MULE At1g40097 was amplified using primers At1g40097-F and At1g40097-R for 35 cycles (94°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min);

Athila-LTR was amplified using primers Athila LTR-F and Athila LTR-R for 35 cycles (94°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 90 s);

FWAtr was amplified using primers FWAtr-F and FWAtr-R (Pontier et al., 2005) for 40 cycles (94°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 1 min);

180-bp repeats were amplified using primers 180(all)-F and 180(all)-R (Johnson et al., 2002) for 30 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 90 s)

ACT2 was amplified using ACT2-F and ACT2-R primers 25 cycles (95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s).

AtSN1 transcripts were detected using AST15 and ATSN1-F4 primers as described (Herr et al., 2005). All PCRs were ended by a final elongation of 10 min at 72°C. Reverse transcription reactions and cDNA amplification of *MOM1* transcript were performed as previously described (Tariq et al., 2002).

Real-time RT-PCR

Total RNA was extracted using TRI-reagent (Sigma) and aliquots of 3 µg were treated with the RQ1-DNase (Promega) to remove genomic DNA. Absence of genomic DNA contamination in the RNA samples was then controlled by verifying that a PCR (45 cycles) with 180(all)-F and 180(all)-R yielded no amplification. cDNA synthesis was performed on 1 µg total RNA using random hexanucleotides (Roche) as described previously (Mathieu et

al., 2003). One microliter cDNA was used in a 25 µl PCR reaction using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) and data were collected using a Roche LightCycler. Each real-time RT-PCR run included, as an internal reference, a reaction for *ACTIN2*. The comparative threshold cycle (C_t) method was used to determine relative RNA levels. The primer sets were 106Bq-F and 106Bq-R-1 for *106B*, 5SUNIV2 and RTPCR5S1 for *5S-210*, ACT2-F and ACT2-R for *ACTIN2* (See supplementary table 1).

Detection of minor 5S rRNAs

Reverse transcription reactions were performed as described (Mathieu et al., 2003). 5S cDNA amplification was performed on 50 ng of the cDNA samples using the primers RTPCR5S1 and RTPCR5S2 as described previously (Mathieu et al., 2003). Complete removal of the 5S genomic rDNA in the reverse-transcribed samples was controlled by verifying that a PCR step (40 cycles) using primers 5SUNIV1 and 5SUNIV2 yielded no amplification (Mathieu et al., 2003). PCR products were subcloned in the pGEM-T easy plasmid and sequencing was performed using a CEQ 2000 Dye terminator cycle sequencer (Beckman). Minor 5S rRNA frequencies were compared with Fisher's exact test for a 2x2 contingency table and probabilities were calculated from a one-tailed test.

Supplementary Table 1.

List of primers

Target	Primer	Sequence (5'-3')	Metho
5S rDNA	RTPCR5S1	GGATGCGATCATACCAG	RT-PCR,
	RTPCR5S2	GAGGGATGCAMCACSAG	ChIP-RT-
	5SUNIV1	CTTTTCGGGCNTTTTNGTG	Genom
	5SUNIV2	CGAAAAGGTATCACATGCC	RT-PCR,
	5S-F	TTGGGCTATATTACGGACCCA	Southern blot
	5S-R	GTCTTGCTTCTTTTCGTCGGAG	probe
<i>TUBULIN</i>	TUB8-F	ATAACCGTTTCAAATTCTCTCTCTC	ChIP
8	TUB8-R	TGCAAATCGTTCTCTCCTTG	
<i>Ta2</i>	Ta2-F	AAACGATGCGTTGGGATAGGTC	ChIP
	Ta2-R	ATACTCTCCACTTCCCGTTTTTCTTTT	
<i>Ta3</i>	Ta3 middle-F	GATTCTTACTGTAAAGAACATGGCATTG	RT-PCR
	Ta3 middle-R	TCCAAATTTCCTGAGGTGCTTGTAACC	

<i>MULE</i>	At1g40097-F	GGTTTGTGATACCGAATTTTG	RT-
At1g4009	At1g40097-R	AGCGGAGGAATATACAACCTC	PCR
7			
<i>MULE</i>	At1g43280-F	GGTTAGGAAAGTGAAGCTTGAG	RT-
At1g4328	At1g43280-R	CCAGTGAGACAAAGGCATAC	PCR
0			
<i>Athila-</i>	Athila LTR-F	TGTTTCATCCACGTTTCATCTC	RT-
LTR	Athila LTR-R	AGCAATAAGCGCAACTAATCC	PCR
<i>AtSN1</i>	ATSN1-F4	AAAATAAGTGGTGGTTGTACAAGC	RT-
	ATS15	ACCAACGTGCTGTTGGCCAGTGGTAAA	PCR
<i>FWAtr</i>	FWAtr-F	TCCCATTC AACATTCATACGAGCGCCGC	RT-
	FWAtr-R	TCTGATATTTGGCTGGAAAAACAACAA	PCR
<i>ACTIN2</i>	ACT2-F	CTAAGCTCTCAAGATCAAAGGC	RT-
	ACT2-R	AACATTGCAAAGAGTTTCAAGG	PCR
	106B-F	TTGATTGATAGATCCCTTCTGGA	RT-
<i>106B</i>	106B-R	CGAGGATGGGGTAATTGAGT	PCR
repeats	106Bq-F	TCATTATGCTAGGTGGTTGA	Real-
	106Bq-R-1	GACAACAAGTTCATTAACCA	time
			RT-
180-bp	180(all)-F	ACCATCAAAGCCTTGAGAAGCA	RT-
repeats	180(all)-R	CCGTATGAGTCTTTGTCTTTGTATCTTCT	PCR
	CD29-F	GCTCCTCTGCAACTTCAGCAATCATC	RT-
<i>MOM1</i>	CLA3-R	TCATCAATTTGTGTTGTGTGATCAGA	PCR;
	MOM1-F	CCAAACTGGTAATTAAACGTTTG	Probe
	MOM1-R	TTACTGACAAGAAGCTTTTGGG	Southern blot
			probe
<i>PFK-β</i>	B8F	GCCACGAAAACCAAACAGAC	
(<i>At4g0404</i>)	B8R	CCGGAATTTTCGATCAATCCT	ChIP
0)			

Legend to Supplementary Figure 1.

Sequence alignments of 5S-210 transcripts.

(A) Multiple sequence alignment of 5S-210 RT-PCR products from Columbia (Col) wild-type plants with the major 5S rRNA sequence. (B) Multiple sequence alignment of 5S-210 RT-PCR products from *ddm1-2* mutant plants with the major 5S rRNA sequence. Nucleotide positions diverging from the sequence of the major 5S rRNA are highlighted in yellow. Dots highlighted in yellow indicate the position of the chromosome-specific T-stretch (Cloix et al., 2002). Alignments were carried out using the CLUSTALW v.1.8 software (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/Options/clustalw.html>).

Legend to Supplementary Figure 2.

DNA methylation of *TSI*, *106B* LTR-like repeats and 180-bp satellite repeats.

Genomic DNA was purified from leaves of three-week-old plants and digested with *HpaII* or *MspI*. The DNA gel-blot was successively hybridized to *TSI*-A15 (A), *106B* (B) and 180-bp probes (C). WT, wild-type; *Ler*, Landsberg *erecta*; Zh, Zürich.

References for Supplementary Information

- Cloix, C., Tutois, S., Yukawa, Y., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G. and Tourmente, S. (2002) Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. *Genome Res*, **12**, 132-144.
- Haizel, T., Merkle, T., Pay, A., Fejes, E. and Nagy, F. (1997) Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *Plant J*, **11**, 93-103.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. and Baulcombe, D.C. (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, **308**, 118-120.
- Johnson, L., Cao, X. and Jacobsen, S. (2002) Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol*, **12**, 1360-1367.
- Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet*, **37**, 761-765.
- Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I. and Tourmente, S. (2003) Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**, 2929-2939.
- May, B.P., Lippman, Z.B., Fang, Y., Spector, D.L. and Martienssen, R.A. (2005) Differential Regulation of Strand-Specific Transcripts from *Arabidopsis* Centromeric Satellite Repeats. *PLoS Genet*, **1**, e79.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. and Lagrange, T. (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **19**, 2030-2040.
- Tariq, M., Habu, Y. and Paszkowski, J. (2002) Depletion of MOM1 in non-dividing cells of *Arabidopsis* plants releases transcriptional gene silencing. *EMBO Rep*, **3**, 951-955.

Supplementary Fig 1A

RTPCR5S1

----->

Major 5S rRNA 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_1 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_2 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_3 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_4 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_5 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_6 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_7 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_8 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_9 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_10 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_11 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_12 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_13 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_14 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

col_15 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

Major 5S rRNA 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_1 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_2 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_3 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_4 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTT-----GGTTAAAAAC

col_5 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_6 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_7 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_8 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_9 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_10 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_11 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTT-----GGTTAAAAAC

col_12 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTT-----TTTGGTTAAAAAC

col_13 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_14 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTTTTTTTTGGTTAAAAAC

col_15 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTT-----TTTTTTTGGTTAAAAAC

Major 5S rRNA 156 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_1 153 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_2 157 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_3 135 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_4 154 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_5 156 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_6 156 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_7 156 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_8 156 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_9 156 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_10 156 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_11 140 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_12 144 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_13 158 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_14 157 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

col_15 142 TTTATGACTCCATAACTTTTAGAACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

<-----

5SUNIV2

Supplementary Fig 1B

RT-PCR551

Major 5S rRNA 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_1 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_2 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_3 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_4 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_5 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_6 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_7 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_8 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_9 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_10 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_11 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_12 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_13 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_14 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

ddm1-2_15 1 GGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTA

Major 5S rRNA 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_1 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_2 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_3 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_4 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_5 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_6 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_7 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_8 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_9 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_10 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_11 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_12 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_13 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_14 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

ddm1-2_15 81 GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACCTTTTTGTTTTGGTTAAACTTTA

Major 5S rRNA 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_1 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_2 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_3 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_4 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_5 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_6 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_7 148 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_8 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_9 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_10 152 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_11 158 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_12 161 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

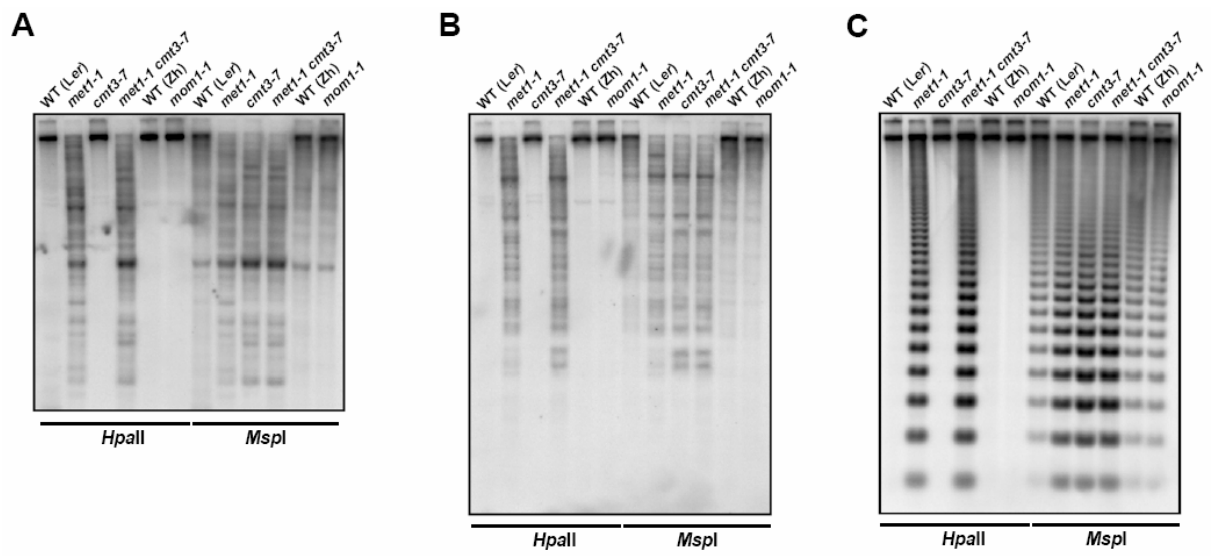
ddm1-2_13 154 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_14 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

ddm1-2_15 160 TGACTCCATAACTTTT-AGACCGTGAGGCCAAACTTGGCATGTGATACCTTTTCG

5SUNIV2

Supplementary Fig 2.



Résultats supplémentaires

Parallèlement à l'étude de l'implication de différentes protéines dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S —DDM1, MOM1 et les ADN méthyltransférases MET1 et CMT3— nous nous sommes également intéressés à KYP (SUVH4), HDA6, et AGO4.

AGO4 appartient à la famille des protéines ARGONAUTE et est connue pour être impliquée dans le phénomène de RdDM, participant par exemple au « silencing » de FWA (Chan et al., 2004). Trois points nous ont amené à formuler l'hypothèse que la voie de la RdDM participe au « silencing » des gènes d'ARNr 5S : (i) les gènes d'ARNr 5S sont fortement méthylés au niveau des cytosines y compris en contextes asymétriques (Mathieu et al., 2002); (ii) de petits ARN correspondant aux gènes d'ARNr 5S sont abondants chez *Arabidopsis* (Xie et al., 2004); (iii) dans des plantes mutantes *ago4*, la méthylation de l'ADNr 5S est diminuée et la quantité des petits ARN 5S est fortement réduite (Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2004).

Par ailleurs, Aufsatz et al. ont suggéré que HDA6 permettrait de renforcer le phénomène de RdDM (Aufsatz et al., 2002b). De plus, HDA6 participe au « silencing » de l'ADNr et d'éléments transposables et la mutation *hda6* entraîne une diminution de la méthylation ADN de ces cibles (Lippman et al., 2003; Probst et al., 2004). Enfin, dans des plantes mutantes *kyp*, certaines cibles possèdent une réduction de la diméthylation H3K9 et de la méthylation ADN, et sont réactivées (Jackson et al., 2002 ; Johnson et al., 2002).

Nous avons étudié l'impact de ces trois mutants sur la méthylation de l'ADNr 5S par des analyses de Southern blots. L'ADN génomique de chaque génotype et de plantes sauvages a été digéré par les enzymes HpaII ou MspI. Ces expériences ont montré que la mutation *sill* (un allèle mutant de *HDA6*) entraîne une diminution de la méthylation CNG de l'ADNr 5S, et que la mutation *ago4-1* induit une faible diminution des méthylations CG et CNG (figure 21). Contrairement, la mutation *kyp-2* n'entraîne pas de réduction de la méthylation de l'ADNr 5S mais une légère hyperméthylation CNG (figure 21). Ce résultat semble être allèle spécifique, car récemment Ebbs et al. ne l'ont pas observé avec un autre allèle mutant de SUVH4 (KYP) (Ebbs and Bender, 2006). Nous avons voulu savoir si ces trois mutants ont une influence sur l'expression des gènes d'ARNr 5S. Pour cela nous avons analysé l'expression des ARNr 5S-210 (voir article n°3) ainsi que le taux d'ARNr 5S

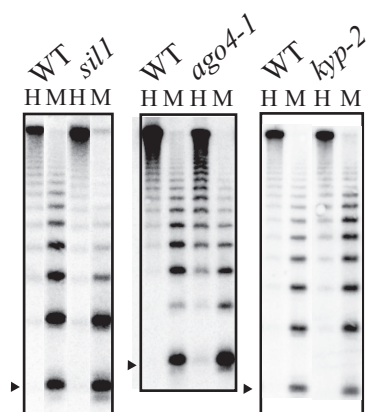


Figure 21: Méthylation de l'ADNr 5S.

De l'ADN de plantules WT, *sil1*, *ago4-1* et *kyp-2*, a été extrait, puis digéré soit avec HpaII (H), soit avec MspI (M). Les échantillons ont servi à réaliser des Southern blots qui ont été hybridés avec une sonde ADNr 5S.

Les triangles indiquent la bande monomérique de 500 pb.

Tableau 4. Proportion d'ARNr 5S minoritaires

Echantillon	Nombre total de clones ^a	Pourcentage d'ARNr 5S minoritaires	Niveau de significativité ^b
WT(L)	96	1.0	référence
<i>met1</i> (L)	93	8.6	0.015*
<i>cmt3</i> (L)	91	8.8	0.014*
<i>met1cmt3</i> (L)	96	3.1	0.31
<i>ago4</i> (L)	64	10.9	0.007**
<i>sil1</i> (L)	71	14.1	0.0009**
<i>kyp</i> (L)	93	9.7	0.007**

^a Nombre total de clones = nombre de clones ARNr 5S minoritaires + nombre de clones ARNr 5S majoritaires obtenus.

^b Niveaux de significativité : *, 0.05 ; **, 0.01 (Fisher's exact test).

(L) : écotype Landsberg *erecta*

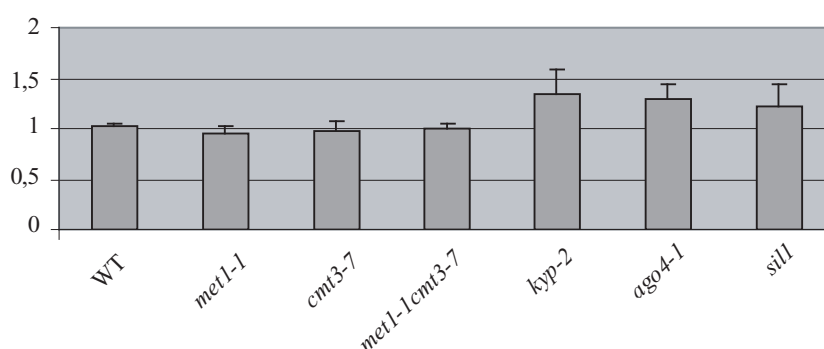


Figure 22: Taux global d'ARNr 5S.

Des extractions d'ARN ont été effectuées dans des plantules WT, *met1-1*, *cmt3-7*, *met1-1cmt3-7*, *kyp-2*, *ago4-1* et *sil1*. Des northern blots ont été réalisés avec ces ARN, et hybridés avec une sonde RAN (RAS-related nuclear protein) puis une sonde ADNr 5S. Les signaux 5S ont été normalisés avec les signaux RAN. L'histogramme représente les résultats d'au moins quatre expériences indépendantes. La déviation standard des différentes données est représentée sur chaque barre.

minoritaires. Plusieurs expériences indépendantes n'ont montré aucune différence d'amplification de l'ARNr 5S-210 dans des plantules mutantes *sil1*, *ago4-1* et *kyp-2* par rapport à des plantes sauvages (données non montrées). Nous avons alors procédé à des RT-PCR amplifiant les ARNr 5S de 120 pb qui ont été par la suite séquencés, de la même façon que dans l'article n° 2. Ainsi, les mutants *sil1*, *ago4-1* et *kyp-2* possèdent une augmentation significative de la proportion d'ARNr 5S minoritaires (tableau 4 ; test exact de Fisher $P < 0.01$). Le taux global d'ARNr 5S restant inchangé entre des plantes sauvages et les trois géotypes mutants, l'augmentation du taux d'ARNr 5S minoritaires n'est pas due à une augmentation globale de la transcription 5S (figure 22). Nous pouvons donc en conclure que AGO4, HDA6 et KYP sont impliquées dans la répression de l'expression des ARNr 5S minoritaires. De plus, ces résultats montrent que la répression de l'expression d'ARNr 5S minoritaires et la répression de l'expression de l'ARNr 5S-210, ne traduisent pas exactement le même type de « silencing » 5S.

Dans l'article n°3, nous avons montré que MET1 participe à la répression de l'expression des ARNr 5S-210 et que MOM1 est impliquée dans la répression de l'expression à la fois des ARNr 5S-210 et des ARNr 5S minoritaires. Nous avons voulu connaître le taux d'ARNr 5S minoritaires dans les mutants *met1-1*, *cmt3-7* et le double mutant *met1-1cmt3-7*. Comme montré dans le tableau 4, les plantes mutantes *met1-1* et *cmt3-7* possèdent une proportion d'ARNr 5S minoritaires accrue par rapport à des plantes WT (test exact de Fisher, $P < 0.05$), alors que leur taux global d'ARNr 5S est inchangé (figure 22). Ces résultats confirment que les ARNr 5S-210 et les ARNr 5S minoritaires ne permettent pas d'étudier exactement le même type de « silencing » ; ainsi dans des plantes mutantes *cmt3-7*, le niveau d'expression des ARNr 5S-210 est inchangé par rapport à des plantes WT, alors que le taux d'ARNr 5S minoritaires est augmenté (article n°3 et tableau 4). En revanche, parmi les ARN majoritaires et minoritaires amplifiés avec les primers encadrant la séquence transcrite de 120 pb, il est probable que des ARNr 5S-210 soient dénombrés, les ARNr 5S-210 couvrant la séquence de 120 pb (voir article n°3).

De façon surprenante, les plantes doubles mutantes *met1-1cmt3-7* possèdent un taux d'ARNr 5S minoritaires équivalent à des plantes sauvages (tableau 4 ; $P > 0.05$), contrairement aux plantes simples mutantes qui possèdent un taux d'ARNr 5S minoritaires augmenté. Ceci appuie les résultats obtenus au niveau des ARNr 5S-210 dont l'expression est fortement augmentée dans des plantes *met1-1* alors qu'elle est moindrement activée dans le double mutant *met1-1cmt3-7* (article n°3). Comme déjà évoqué dans l'article n°3, nous pouvons formuler l'hypothèse qu'un mécanisme de répression est activé ou renforcé dans

les plantes *met1-1cmt3-7*, et empêche ainsi une dérépression trop importante des gènes 5S. MOM1 pourrait être impliqué dans cette répression renforcée étant donné que son expression est augmentée dans le double mutant *met1-1cmt3-7* et dans le mutant *cmt3-7* (article n°3). Cette hypothèse semble concorder avec l'expression des ARNr 5S-210. En revanche, dans les plantes *cmt3-7*, le taux d'ARNr 5S minoritaires est élevé alors que l'expression de MOM1 est augmentée.

Discussion et Perspectives

1. Les facteurs TFIIIA et TFIIIAbis

a. Epissage alternatif

Nous avons caractérisé le facteur de transcription spécifique des gènes d'ARNr 5S, TFIIIA (article n°1). Cette étude rapporte la première caractérisation de TFIIIA chez une plante. Une analyse manuelle a permis d'identifier une seule protéine possédant neuf doigts de zinc dans les banques de données d'*Arabidopsis*. Cette protéine ayant la caractéristique principale des protéines TFIIIA connues (neuf doigts de zinc), elle était une bonne candidate pour être TFIIIA d'*Arabidopsis*. Cette protéine a été exprimée en bactérie et sa liaison à l'ADNr 5S et à l'ARNr 5S, ainsi que son activité transcriptionnelle *in vitro*, ont été démontrées.

Lors de l'amplification de l'ADNc de TFIIIA à partir d'une banque d'ADNc de cellules d'*Arabidopsis*, nous avons amplifié deux ADNc résultant de l'épissage alternatif du même gène. Le deuxième ADNc code une protéine identique à TFIIIA sur toute sa longueur, mais dépourvue des deux premiers doigts de zinc N-terminaux de TFIIIA. Ce produit d'épissage alternatif a été appelé TFIIIAbis. Certains épissages alternatifs sont produits uniquement dans des conditions de stress, lors de traitements hormonaux, ou de façon tissu spécifique (Gong et al., 2004; Kazan, 2003; Li et al., 2006). D'après nos expériences, TFIIIAbis est présent dans tous les tissus testés ainsi que dans des cellules en culture qui se répliquent activement ; il est de plus la forme majoritaire d'épissage. TFIIIAbis semble donc posséder une fonction de « ménage » nécessaire à tout type de cellules d'*Arabidopsis*.

L'ADNc de TFIIIAbis contient le cadre de lecture utilisé par TFIIIA, mais celui-ci est interrompu par un codon STOP présent au niveau de l'exon alternatif. Ce codon STOP peut représenter un codon de terminaison de traduction prématuré (PTC : « premature translational termination codon ») et ainsi induire la voie NMD (« nonsense-mediated mRNA decay ») qui dégrade les ARNm possédant des PTC (Baker and Parker, 2004; Conti and Izaurralde, 2005). Cependant, la voie NMD reste très mal connue chez les plantes. Dans un article récent, la mutation du gène codant la protéine AtUPF1 homologue d'une protéine impliquée dans la voie NMD chez les mammifères et les levures (Culbertson and Leeds, 2003), entraîne l'augmentation ou la diminution du taux de transcrits d'un certain nombre de gènes en réponse à un traitement au sucrose, par rapport au taux de ces mêmes transcrits dans des plantes sauvages traitées au sucrose (Yoine et al., 2006). En particulier, une forte augmentation du transcrit TFIIIAbis dans ces conditions expérimentales, appelé « transcript 2 » dans cet article, a été décrite par ses auteurs (Yoine et al., 2006). Ceci pourrait suggérer

que dans des plantes sauvages traitées au sucrose, une proportion importante des ARNm TFIIIAbis est dégradée par la voie NMD. Cependant, les auteurs n'ont pas étudié la stabilité des ARNm analysés ni leur taux de transcription. On ne peut donc pas conclure si la mutation de *AtUPF1* entraîne une augmentation de la stabilité des ARNm TFIIIAbis, une augmentation de la transcription du gène *TFIIIA*, et/ou une augmentation d'une forme d'épissage (TFIIIAbis) par rapport à l'autre (TFIIIA). De plus, ces auteurs décrivent une augmentation du taux des transcrits du gène *TFIIIA* (TFIIIA et TFIIIAbis) dans des plantes sauvages traitées au sucrose par rapport à des plantes sauvages traitées à l'eau, ce qui montre que l'expression du gène *TFIIIA* répond à un traitement au sucrose. D'ailleurs, ces auteurs démontrent que *AtUPF1* est impliqué dans la voie de signalisation de réponse au sucre. On peut donc en conclure, qu'en réponse au sucrose, la quantité de l'ARNm précurseur transcrit à partir du gène *TFIIIA* (pouvant produire les ARNm matures TFIIIA ou TFIIIAbis) est augmentée et que *AtUPF1* est impliqué dans le contrôle de la balance des formes épissées TFIIIA et TFIIIAbis.

b. Localisation nucléaire de TFIIIAbis

D'après nos expériences de retards sur gel, TFIIIAbis peut lier l'ADNr 5S ainsi que les ARNr 5S. De plus, les transformations transitoires de protoplastes ont montré que TFIIIAbis possède une localisation nucléaire, et s'accumule au niveau du nucléole et au niveau d'autres foci. On peut donc formuler les mêmes hypothèses que pour TFIIIA (article n°1) : (i) TFIIIAbis peut amener les ARNr 5S du nucléoplasme au lieu d'assemblage des ribosomes, le nucléole. Comme évoqué dans la partie synthèse bibliographique (chapitre I, section 2), il est connu que le transport des ARNr 5S du nucléoplasme au nucléole se fait grâce à la liaison de ces ARN par la protéine L5. Etant donné que TFIIIAbis lie les ARNr 5S, et qu'il est fortement accumulé dans le nucléole, on peut supposer que cette protéine permet également le transport nucléoplasme/nuécléole des ARNr 5S. (ii) Les foci supplémentaires au niveau du noyau peuvent représenter les lieux de liaison de TFIIIAbis sur l'ADNr 5S et/ou les corps de Cajal où TFIIIAbis pourrait s'accumuler et être intégré à la machinerie transcriptionnelle polymérase III. En effet, les corps de Cajal sont considérés par certains auteurs comme des sites primaires d'assemblage de la machinerie transcriptionnelle dans le noyau (Gall et al., 1999; Murphy et al., 2002).

c. Hypothèses sur la fonction de TFIIIAbis

TFIIIAbis exprimée en bactéries et en protoplastes, possède les mêmes propriétés de liaison à l'ADNr 5S et à l'ARNr 5S et la même localisation nucléaire, que TFIIIA. Les sept doigts de zinc de TFIIIAbis sont donc suffisants pour permettre ces liaisons et cette localisation. Nous procédons actuellement à des expériences de retards sur gel pour définir si TFIIIAbis et TFIIIA lient l'ADNr 5S et l'ARNr 5S avec les mêmes affinités. TFIIIA et TFIIIAbis étant toutes deux fortement concentrées au niveau du nucléole, on peut supposer qu'une fois que les ARNr 5S sont transcrits, ces deux protéines prennent en charge ces ARN et permettent leur transport du nucléoplasme au nucléole où les ARNr 5S sont assemblés au niveau des particules ribosomales.

Une différence majeure entre TFIIIA et TFIIIAbis est que, dans un système de transcription polymérase III *in vitro*, TFIIIAbis ne stimule pas la transcription d'un gène d'ARNr 5S. Les deux premiers doigts de zinc N-terminaux de TFIIIA paraissent donc essentiels à la fonction de facteur de transcription de TFIIIA. TFIIIAbis ne possède pas non plus d'activité répressive sur la transcription d'un gène d'ARNr 5S *in vitro*. Nous avons voulu expérimenter l'effet d'une déplétion de TFIIIAbis sur l'expression des gènes d'ARNr 5S *in vivo*. TFIIIAbis et TFIIIA résultant d'épissages alternatifs du même ARNm précurseur, j'ai utilisé une technique de RNAi pour cibler spécifiquement l'ARNm mature de TFIIIAbis (celui-ci ayant une partie supplémentaire par rapport à l'ARNm mature de TFIIIA). J'ai ainsi créé différentes lignées de plantes RNAi mais l'analyse de l'expression de TFIIIAbis et de TFIIIA, par une méthode de RT-PCR, n'a pas permis de voir de variation du taux de ces deux transcrits en comparaison avec des lignées contrôles. Ce type d'observation est fréquent lors de l'utilisation de technique RNAi. Plusieurs lignées de plantes RNAi possédaient des phénotypes contrairement aux lignées contrôles. Ces phénotypes semblent être dose dépendants car dans la deuxième génération de plantes RNAi, certaines lignées ont perdu leur phénotype, ceci étant certainement lié à la ségrégation de certaines insertions de la construction RNAi. Dans différentes plantes RNAi de première et de deuxième génération, le taux global d'ARNr 5S est diminué. Ceci indique que TFIIIAbis aurait un effet positif sur la quantité globale d'ARNr 5S. TFIIIAbis pourrait être impliqué dans la transcription et/ou la stabilisation des ARNr 5S. Etant donné que TFIIIAbis ne possède pas d'activité transcriptionnelle *in vitro*, on peut supposer que cette protéine aurait plutôt une fonction permettant de stabiliser les ARNr 5S. Ainsi, dans les lignées de plantes RNAi, les ARNr 5S liés normalement par TFIIIAbis se retrouvent alors « libres » et pourraient être dégradés ou pris en charge par des protéines TFIIIA.

L'association de TFIIIA aux ARNr 5S empêcherait son association à l'ADNr 5S diminuant ainsi le taux de transcription. On peut également formuler l'hypothèse que TFIIIAbis agirait sur l'organisation chromatinienne de l'ADNr 5S et influencerait de manière positive sa transcription. Différentes approches expérimentales supplémentaires sont nécessaires afin de trancher entre ces hypothèses (voir « Perspectives de travail »).

TFIIIA et/ou TFIIIAbis sont essentielles à la survie des plantes *Arabidopsis* ; en effet un mutant dans lequel un T-DNA est inséré dans la séquence codante du gène *TFIIIA/Abis*, est léthal à l'état homozygote (données non présentées).

2. Impact de la structure de la chromatine sur l'expression des gènes d'ARNr 5S

L'équipe soupçonnait l'implication d'une régulation épigénétique dans la répression de l'expression d'une fraction des gènes d'ARNr 5S, dont les gènes d'ARNr 5S minoritaires. Une étude de l'expression de ces derniers a donc été réalisée dans des mutants de TGS. Ainsi nous avons pu montrer par des expériences de RT-PCR et de séquençage, que le taux de transcrits minoritaires 5S est augmenté dans des plantes mutantes *ddm1* (article n°2). Dans ce même article, nous avons pu établir clairement, une relation inverse entre le taux de méthylation de l'ADNr 5S et le pourcentage d'ARNr 5S minoritaires retrouvé parmi les ARNr 5S. En revanche, le taux global d'ARNr 5S dépend du niveau d'expression de son facteur de transcription spécifique, TFIIIA, et non pas de la méthylation ADN. Avec la méthylation de l'ADN, la méthylation H3K9me2 marque l'hétérochromatine, alors que la méthylation H3K4me2 est surtout retrouvée au niveau de l'euchromatine. Nous avons voulu connaître le niveau de ces deux types d'histones méthylées dans des plantes sauvages et *ddm1*. En collaboration avec l'équipe de V. Colot (Evry, France), j'ai réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans ces deux types de plantes. Ainsi, nous avons constaté que les niveaux de H3K9me2 et H3K4me2 de l'ADNr 5S de plantes sauvages sont inversés dans les plantes *ddm1*, montrant une concordance entre un niveau élevé H3K4me2, un faible niveau H3K9me2, et l'expression des ARNr 5S minoritaires. Le séquençage des produits d'amplification PCR réalisée sur l'ADN obtenu par ChIP, a permis de déterminer de quels loci 5S provenaient les unités 5S précipitées. Dans des plantes sauvages, environ 90 % des unités 5S immunoprécipitées avec un anticorps anti-H3K9me2 appartiennent aux loci 5S transcrits (chromosome 4 et grand locus du chromosome 5), alors que 10 % proviennent des loci non transcrits. H3K9me2 marque donc beaucoup plus les loci transcrits que les loci non transcrits. Les loci 5S non transcrits n'ont pas la capacité à être exprimés quelque soit les histones modifiées qui leur sont associées et

quelque soit leur méthylation ADN ; contrairement, de nombreux gènes appartenant aux loci 5S transcrits ont la capacité à être exprimés. On peut spéculer que les histones H3K9me2, essentiellement retrouvées au niveau de ces loci 5S « actifs », permettraient d'empêcher que toutes les unités qui ont la capacité à être transcrites, le soient.

Le fait que dans des plantes sauvages les unités ADNr 5S soient associées à la fois à H3K9me2 et à H3K4me2, renforce l'idée que deux fractions d'ADNr 5S existent, l'une ayant des caractéristiques hétérochromatiques et l'autre des caractéristiques euchromatiques. La fraction euchromatique 5S se trouverait au niveau des boucles 5S (qui ont été visualisées par une méthode de FISH), serait hypométhylée au niveau de son ADN et porterait des histones H3K4me2 ; alors que la fraction hétérochromatique co-localiserait avec les chromocentres, serait hyperméthylée au niveau de son ADN, et associée avec des histones H3K9me2. On ne peut cependant pas exclure que certains gènes d'ARNr 5S portent ces deux types d'histones modifiées.

Les données de FISH 5S des noyaux de plantes sauvages et *ddm1*, considérées avec le taux d'ARNr 5S minoritaires dans ces plantes, amènent à la conclusion que la présence élevée des ARNr 5S minoritaires dans *ddm1* est due à une relocalisation de gènes 5S minoritaires dans des boucles euchromatiques. Cependant, dans des tissus (sauvages ou *ddm1*) âgés de deux jours après germination, la proportion des ARNr 5S minoritaires est élevée malgré la co-localisation de tout l'ADNr 5S avec les préchromocentres. Soit les ARNr 5S extraits dans ces tissus sont produits auparavant, dans la graine ou la fleur, soit les marques et/ou les protéines répressives ne sont pas complètement mises en place à ce stade de développement, ce qui permet l'expression d'ARNr 5S minoritaires. A ce stade précoce de développement, la méthylation de l'ADNr 5S est d'ailleurs peu élevée par rapport à des stades plus tardifs (article n°2). Si une transcription des gènes 5S a lieu dans ces tissus de deux jours, elle est peu efficace car le taux global d'ARNr 5S est fortement diminué par rapport à des tissus de quatre jours ou de trois semaines, bien que l'abondance de TFIIA soit la même dans tous ces tissus.

DDM1 est connue pour être une protéine de remodelage de la chromatine, et sa mutation provoque de nombreux effets, dont une désorganisation de la chromatine. Nous avons utilisé des mutants d'ADN méthyltransférases afin de comprendre plus finement la relation entre le « silencing » des gènes d'ARNr 5S et leur méthylation ADN. D'après nos résultats, MET1 et CMT3 sont impliquées dans le « silencing » des gènes d'ARNr 5S minoritaires ce qui montre que la méthylation CG aussi bien que la méthylation CNG réprime l'expression des gènes d'ARNr 5S minoritaires (voir « Résultats

supplémentaires »). Nous avons aussi analysé la présence d'ARNr 5S minoritaires dans les mutants *ago4*, *sill*, et *kyp*. Il avait déjà été montré un impact des mutations *ago4* et *sill* (un allèle mutant de *HDA6*) sur la méthylation de l'ADNr 5S sans que le « silencing » des gènes d'ARNr 5S n'ait été étudié. Les résultats donnés dans la partie « Résultats supplémentaires » de ce manuscrit montrent que les effets, très certainement indirects, des mutations *ago4* et *sill* sur la méthylation ADN, coïncident avec une dérepression des gènes d'ARNr 5S minoritaires. Dans les plantes *kyp*, bien qu'aucun effet sur la méthylation ADN ne soit observé, les gènes 5S minoritaires sont dérprimés. Tout comme certains transposons (Lippman et al., 2003), les gènes d'ARNr 5S sont la cible de HDA6, KYP, et d'une protéine ARGONAUTE (AGO4 dans le cas des gènes 5S). L'ADNr 5S semble être la cible de la voie de la RdDM puisque la mutation de *AGO4*, qui fait partie de cette voie, entraîne une forte diminution des siRNA 5S, une baisse de la méthylation de l'ADNr 5S, et une levée de « silencing » des gènes d'ARNr 5S minoritaires.

Les patrons de méthylation H3K9me2 semblent être maintenus par l'action concertée de plusieurs protéines de la famille SUVH à laquelle appartient KYP. Ainsi, la mutation de *KYP* n'a pas d'effet sur H3K9me2 au niveau de l'ADNr 5S (Mathieu et al., 2005). Au niveau de certains loci, la méthylation H3K9me2 dirige la méthylation ADN CNG via CMT3. Récemment, il a été montré que KYP (SUVH4), SUVH5 et SUVH6 sont toutes les trois nécessaires à la maintenance de la méthylation CNG de l'ADNr 5S (Ebbs and Bender, 2006). Ces résultats suggèrent que l'effet de la mutation de *KYP* sur le « silencing » des répétitions 5S pourrait être indépendant de la méthylation H3K9 et de la méthylation CNG. Le nombre élevé des copies de gènes d'ARNr 5S pourrait toutefois masquer un effet ciblé de la mutation de *KYP* sur un nombre limité de répétitions.

3. Découverte d'un nouveau type de transcrit provenant des gènes d'ARNr 5S

Jusqu'à présent, les ARN provenant de la transcription des gènes d'ARNr 5S mis en évidence étaient les transcrits de 120 bases retrouvés au niveau des ribosomes, et les siRNA 5S. Dans l'équipe, il avait été montré qu'une séquence de quatre T, située en aval de la séquence 120 pb au niveau de tous les loci 5S, est suffisante pour la terminaison de transcription par la polymérase III (Cloix et al., 2003).

Lors de notre étude du « silencing » des gènes d'ARNr 5S, nous avons amplifié des transcrits de 210 nucléotides par RT-PCR (article n°3). Ces ARN comportent les 120 nucléotides des transcrits 5S retrouvés au niveau des ribosomes, mais possèdent 90 nucléotides supplémentaires en 3' correspondant à une partie de l'espaceur des gènes 5S.

Ceci semble contradictoire avec les résultats d'arrêt de transcription de Cloix et al. (Cloix et al., 2003). Nous avons obtenu les produits d'amplification de 210 pb par des expériences de RT-PCR en une étape dans lesquelles la rétro-transcription se fait en présence du couple de primers sens et antisens. L'amplification de ces transcrits de 210 nucléotides en RT-PCR en deux étapes (avec l'un ou l'autre de ces primers) a mis en évidence que ce type de transcrits proviendrait d'une transcription antisens par rapport aux transcrits de 120 nucléotides (données non montrées). Ainsi dans le cas d'une transcription par la polymérase III, le signal de fin de transcription ne peut être reconnu. Toutefois, nous ne savons pas si ces transcrits sont effectivement produits par la polymérase III, ou par une autre polymérase. Cette question est abordée dans la partie « Perspectives de travail ».

La levée de « silencing » des ARNr 5S minoritaires dans *cmt3*, *sill*, *ago4*, et *kyp* s'oppose au maintien de la répression transcriptionnelle des ARNr 5S-210 dans ces mutants. Ceci indique que la présence de ces deux types de transcrits ne traduit pas exactement la même levée de « silencing » au niveau des gènes d'ARNr 5S. Il est difficile de savoir si ces deux types de « silencing » se produisent sur les mêmes unités 5S, ou s'ils opèrent sur des gènes 5S distincts.

4. « Silencing » dans le double mutant *met1cmt3*

Nos résultats ont montré une levée de « silencing » plus importante dans *met1cmt3* que dans *met1* au niveau des séquences TSI, des séquences 180 pb, des éléments transposables Ta3 et AtSN1. Cet effet additif des mutations *met1* et *cmt3* avait été observé auparavant au niveau de l'expression des transposons Ta2 et Ta3 (Johnson et al., 2002) et sur la transposition de l'élément CACTA (Kato et al., 2003). Ces différentes données indiquent que CMT3 « silence » certaines cibles indépendamment de MET1 et donc de la méthylation CG.

Lors de l'étude de l'expression des ARNr 5S minoritaires dans les mutants ADN méthyltransférases *met1*, *cmt3*, et *met1cmt3*, une levée de « silencing » des gènes d'ARNr 5S minoritaires a été observée dans les plantes *met1* et *cmt3*, contrairement au « silencing » dans les plantes *met1cmt3*. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec le fait qu'une levée de répression transcriptionnelle des ARNr 5S-210 est observée dans des plantes *met1* et moins dans des plantes *met1cmt3*. Si la légère augmentation des transcrits MOM1 observée dans des plantes *cmt3* et *met1cmt3* est le reflet d'un « silencing » indépendant de la méthylation ADN, renforcé dans ces mutants, elle pourrait expliquer l'absence d'ARNr 5S minoritaires et la moindre levée de « silencing » des ARNr 5S-210 dans les plantes *met1cmt3*. Cette hypothèse est pertinente avec l'absence de levée de « silencing » des ARNr

5S-210 dans *cmt3* mais pas avec la présence d'ARNr 5S minoritaires dans ce même mutant. L'expression des ARNr 5S minoritaires pourrait être plus sensible à une augmentation de la voie impliquant MOM1 dans un contexte très déméthylé ADN comme *met1cmt3*. On ne peut cependant pas exclure qu'un autre phénomène explique les variations d'expression des ARNr 5S minoritaires et des ARNr 5S-210 dans *met1*, *cmt3* et *met1cmt3*.

La levée de « silencing » des séquences répétées (TSI, 106B, 180 pb) qui sont la cible à la fois de MET1 et de MOM1, n'est pas diminuée dans *met1cmt3* par rapport à *met1*. Les gènes 5S semblent donc posséder une particularité qui en font la cible d'une répression additionnelle dans le contexte double mutant *met1cmt3*. Le « silencing » renforcé dans les plantes *met1cmt3* au niveau des ARNr 5S minoritaires et des ARNr 5S-210, pourrait permettre de ne pas laisser s'installer une dérégulation transcriptionnelle trop forte des gènes d'ARNr 5S, qui sont déjà parmi les séquences les plus transcrites dans des plantes sauvages.

5. Impact de MOM1 sur l'expression des séquences répétées hétérochromatiques

Nous avons montré dans l'article n°3 que MOM1 est impliqué dans le « silencing » des séquences répétées hétérochromatiques (les gènes ADNr 5S, les séquences 106B, et les répétitions centromériques 180 pb), alors que la mutation de *MOM1* ne semble pas affecter le niveau d'expression de différents éléments transposables. MOM1 semble donc agir sur des séquences ayant une localisation nucléaire (dans l'hétérochromatine) et une organisation génomique (séquences répétées) particulières. Contrairement à la plupart des mutants de TGS, la mutation *MOM1* permet une activation transcriptionnelle dans des contextes d'ADN méthylé, et dans le cas des gènes d'ARNr 5S, cette mutation n'induit pas non plus de variation des patrons de méthylation de l'histone H3. Par ailleurs, Probst et al. avaient montré que dans des plantes mutantes *mom1*, la levée de TGS de séquences (TSI et locus A) se produit sans changement global de la structure de la chromatine, et sans décondensation de ces séquences ciblées par MOM1 (Probst et al., 2003). Ces résultats suggèrent que dans certains cas, la structure de l'hétérochromatine n'est pas suffisante pour réprimer la transcription de séquences répétées et que MOM1 est essentielle pour « silencer » certains gènes hétérochromatiques. Ceci est confirmé par les résultats obtenus dans l'article n°3.

Récemment, il a été montré que dans des plantes mutantes *mom1*, l'accumulation des siRNA 5S est inchangée par rapport à des plantes sauvages (Elmayan et al., 2005) ; d'après ce résultat, ces auteurs suggèrent que MOM1 ne serait pas impliquée dans la régulation de la transcription des gènes 5S. La dérégulation de l'expression des ARNr 5S minoritaires et des ARNr 5S-210 démontre au contraire cette implication. Ces levées de « silencing » se

produisent donc sans changement de la méthylation ADN, sans modification de la méthylation des histones, et sans variation du taux d'accumulation des petits ARN 5S.

Les données publiées à ce jour ne permettent pas de définir le mode d'action de MOM1. Il est intéressant de noter que toutes les cibles de MOM1 sont des séquences hautement répétées. Ce type de séquences est sujet à des phénomènes de recombinaison qui, s'ils se produisent, peuvent avoir des effets délétères sur le génome. On pourrait émettre l'hypothèse que MOM1 serait impliquée dans l'inhibition de cette recombinaison. Cependant, le phénotype, le développement et la fertilité normale des plantes mutantes *mom1* même après neuf générations d'autofécondation favorisent peu cette hypothèse.

D'après nos résultats et ceux de Mittelsten Scheid et al. (Mittelsten Scheid et al., 2002), parallèlement à la voie de régulation épigénétique dépendante de la méthylation ADN, la voie de MOM1 ajoute un niveau supplémentaire de répression au niveau des séquences hautement répétées hétérochromatiques. MOM1 pourrait avoir un rôle direct de répresseur de la transcription de ces séquences, et pourrait agir spécifiquement sur celles-ci en liant directement l'ADN. La nature de ces séquences répétées et/ou leur localisation nucléaire pourraient être impliquées dans le recrutement de MOM1. Enfin, on peut également émettre l'hypothèse que MOM1 serait recrutée au niveau de ses cibles via une interaction avec d'autres protéines liant directement l'ADN. La caractérisation biochimique de MOM1 ainsi que de ses partenaires putatifs est requise afin de mieux comprendre le mode d'action de cette protéine.

La séquence génomique couvrant le promoteur de *MOM1* est méthylée au niveau de l'ADN. La méthylation CNG de cette séquence est diminuée dans les plantes mutantes *cmt3*, et les méthylations CG et CNG sont réduites dans les plantes *met1* et *met1cmt3*, par rapport à des plantes sauvages (article n°3). L'expression de MOM1 est légèrement augmentée dans les mutants *cmt3* et *met1cmt3*, ce qui suggère que sa transcription est en partie réprimée par la méthylation ADN CNG. Il est intéressant de constater que le gène *MOM1* qui code une protéine impliquée dans une voie de « silencing » indépendante de la méthylation ADN, est lui-même sous l'influence de la voie de « silencing » dépendante de la méthylation. Ainsi, un certain équilibre pourrait exister entre ces deux voies de « silencing ».

6. Perspectives de travail

Au stade de notre étude de TFIIIAbis, il paraît important de caractériser TFIIIAbis sous sa forme protéique. Nous avons fait produire des anticorps dirigés contre TFIIIA et d'autres dirigés contre TFIIIA et TFIIIAbis. Il nous reste à mettre au point les conditions de western

blot, ces deux protéines étant certainement peu représentées parmi les protéines totales de plantes. Ces anticorps nous permettraient de prouver l'existence de ces deux protéines, et d'avoir un outil important aussi bien pour l'étude de TFIIIAbis que de TFIIIA. Par exemple, nous n'avons pas détecté de différence au niveau de la quantité des transcrits TFIIIAbis et TFIIIA dans les lignées de plantes RNAi possédant des phénotypes et ayant une diminution du taux global d'ARNr 5S. Une analyse des ARN polyA en northern blots peut être envisagée pour détecter le taux des deux transcrits mais le meilleur indicateur du niveau d'expression de TFIIIA et de TFIIIAbis serait une détection des protéines. De plus, grâce à de tels anticorps, nous pouvons envisager des expériences de cytologie afin de localiser les protéines TFIIIA et TFIIIAbis exprimées de manière physiologique. Des expériences d'immunolocalisation de TFIIIA couplées à des expériences de FISH permettraient de savoir si les loci 5S des deux chromosomes homologues 4 et les grands loci 5S des deux chromosomes homologues 5, sont tous actifs ou si certains subissent un « silencing », et si la transcription des gènes d'ADNr 5S n'a effectivement lieu qu'au niveau des boucles euchromatiques.

D'après nos résultats, nous avons formulé l'hypothèse que TFIIIAbis stabiliserait les ARNr 5S et /ou aurait un rôle dans l'organisation nucléaire chromatinienne de l'ADNr 5S. Si dans les lignées de plantes RNAi, seule l'expression de TFIIIAbis est touchée, nous aimerions analyser l'état de la chromatine et des boucles euchromatiques d'ADNr 5S de ces lignées. En effet, une diminution de la quantité des ARNr 5S étant observée dans les lignées de plantes RNAi, on peut émettre l'hypothèse que cette variation pourrait être due à une variation de l'état des boucles d'ADNr 5S. L'expression des différents types de transcrits 5S (ARNr 5S minoritaires ; ARNr 5S-210) pourrait aussi être étudiée dans ces plantes afin de déterminer si TFIIIAbis possède une fonction ciblant un type de gène ou d'ARNr 5S particulier. D'autres expériences peuvent aussi être envisagées, comme des expériences de « run-on » et l'étude de la stabilité des ARNr 5S *in vitro* afin de préciser le mode d'action de TFIIIAbis.

Les transcrits 5S-210 ont une taille plus importante que les ARNr 5S de 120 nucléotides, couvrant ces 120 nucléotides ainsi qu'une partie de l'espaceur des gènes 5S ; il existe des petits ARN 5S correspondant également à des séquences de cet espaceur. On peut émettre l'hypothèse que les ARNr 5S-210 soient des précurseurs des petits ARN 5S. Etant donné que la polymérase IV est impliquée dans la production des petits ARN 5S comme le siRNA 1003, il serait donc intéressant d'analyser la transcription des ARNr 5S-210 dans des

plantes mutantes pour la polymérase IV. Des résultats récents suggèrent que cette polymérase (en particulier la POL IVa) agirait comme une RdRP (Pontes et al., 2006), ce qui implique que cette polymérase ne serait pas à l'origine de la transcription des ARNr 5S-210.

Il est peu probable que ces ARN soient transcrits par la polymérase III, car les séquences du promoteur interne et la séquence TATA-like seraient alors en orientation antisens. Ceci pourrait être testé dans un système de transcription POL III *in vitro*. Si les ARNr 5S-210 ne sont transcrits ni par la polymérase IV, ni par la polymérase III, il serait difficile de discriminer l'activité de la polymérase I ou de la polymérase II sur cette transcription. La connaissance de la nature exacte des ARNr 5S-210 permettrait éventuellement de savoir quelle polymérase permet leur transcription. Des expériences de protection à la nucléase S1 peuvent être envisagées afin de déterminer la taille précise de ces transcrits. Enfin, des expériences de 5' et de 3' RACE-PCR permettraient de déterminer le début et la fin de transcription de ces ARN.

Références bibliographiques

1. **Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. and Jenuwein, T.** (1999) Functional mammalian homologues of the Drosophila PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J*, **18**, 1923-1938.
2. **Achwal, C.W., Iyer, C.A. and Chandra, H.S.** (1983) Immunochemical evidence for the presence of 5mC, 6mA and 7mG in human, Drosophila and mealybug DNA. *FEBS Lett*, **158**, 353-358.
3. **AGI.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, **408**, 796-815.
4. **Allison, L.A., Romaniuk, P.J. and Bakken, A.H.** (1991) RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIIA and ribosomal protein L5 during Xenopus oogenesis. *Dev Biol*, **144**, 129-144.
5. **Almouzni, G., Clark, D.J., Mechali, M. and Wolffe, A.P.** (1990) Chromatin assembly on replicating DNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, **18**, 5767-5774.
6. **Almouzni, G., Mechali, M. and Wolffe, A.P.** (1991) Transcription complex disruption caused by a transition in chromatin structure. *Mol Cell Biol*, **11**, 655-665.
7. **Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T. and Jewell, D.** (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans. *Curr Biol*, **13**, 807-818.
8. **Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Scheid, O.M. and Paszkowski, J.** (2000) Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature*, **405**, 203-206.
9. **Ammons, D. and Rampersad, J.** (2001) An E. coli 5S rRNA deletion mutant useful for the study of 5S rRNA structure/function relationships. *Curr Microbiol*, **43**, 89-92.
10. **Ammons, D., Rampersad, J. and Fox, G.E.** (1999) 5S rRNA gene deletions cause an unexpectedly high fitness loss in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, **27**, 637-642.

11. **Aravin, A.A., Klenov, M.S., Vagin, V.V., Bantignies, F., Cavalli, G. and Gvozdev, V.A.** (2004) Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. *Mol Cell Biol*, **24**, 6742-6750.
12. **Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J. and Tuschl, T.** (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, **5**, 337-350.
13. **Archambault, J., Milne, C.A., Schappert, K.T., Baum, B., Friesen, J.D. and Segall, J.** (1992) The deduced sequence of the transcription factor TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* reveals extensive divergence from *Xenopus* TFIIIA. *J Biol Chem*, **267**, 3282-3288.
14. **Assaad, F.F., Tucker, K.L. and Signer, E.R.** (1993) Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, **22**, 1067-1085.
15. **Aufsatz, W., Mette, M.F., Matzke, A.J. and Matzke, M.** (2004) The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Mol Biol*, **54**, 793-804.
16. **Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, A.J. and Matzke, M.** (2002a) RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16499-16506.
17. **Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J.** (2002b) HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *Embo J*, **21**, 6832-6841.
18. **Baker, K.E. and Parker, R.** (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 293-299.
19. **Bartee, L. and Bender, J.** (2001) Two *Arabidopsis* methylation-deficiency mutations confer only partial effects on a methylated endogenous gene family. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2127-2134.

20. **Bartee, L., Malagnac, F. and Bender, J.** (2001) Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev*, **15**, 1753-1758.
21. **Bartel, D.P.** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
22. **Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G. and Aalen, R.B.** (2001) The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4319-4333.
23. **Baylin, S.B. and Herman, J.G.** (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, **16**, 168-174.
24. **Bender, J. and Fink, G.R.** (1995) Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of Arabidopsis. *Cell*, **83**, 725-734.
25. **Berger, S.L.** (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 142-148.
26. **Bernacchia, G., Primo, A., Giorgetti, L., Pitto, L. and Cella, R.** (1998) Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression. *Plant J*, **13**, 317-329.
27. **Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P. and Allshire, R.C.** (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**, 2539-2542.
28. **Besser, D., Gotz, F., Schulze-Forster, K., Wagner, H., Kroger, H. and Simon, D.** (1990) DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. *FEBS Lett*, **269**, 358-362.
29. **Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. and Ingram, V.** (1988) Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The

- p>carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases.
- J Mol Biol*
- ,
- 203**
- , 971-983.
30. **Bieker, J.J., Martin, P.L. and Roeder, R.G.** (1985) Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription. *Cell*, **40**, 119-127.
31. **Bird, A.** (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**, 6-21.
32. **Bogenhagen, D.F. and Brown, D.D.** (1981) Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination. *Cell*, **24**, 261-270.
33. **Bogenhagen, D.F., Sakonju, S. and Brown, D.D.** (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell*, **19**, 27-35.
34. **Bogenhagen, D.F., Wormington, W.M. and Brown, D.D.** (1982) Stable transcription complexes of *Xenopus* 5S RNA genes: a means to maintain the differentiated state. *Cell*, **28**, 413-421.
35. **Bouvet, P. and Wolffe, A.P.** (1994) A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell*, **77**, 931-941.
36. **Brown, D.D. and Littna, E.** (1964) Rna Synthesis During the Development of *Xenopus Laevis*, the South African Clawed Toad. *J Mol Biol*, **12**, 669-687.
37. **Brown, D.D. and Weber, C.S.** (1968) Gene linkage by RNA-DNA hybridization. I. Unique DNA sequences homologous to 4 s RNA, 5 s RNA and ribosomal RNA. *J Mol Biol*, **34**, 661-680.
38. **Brzeski, J. and Jerzmanowski, A.** (2003) Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem*, **278**, 823-828.
39. **Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P.C. and Grewal, S.I.** (2005) Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat Genet*, **37**, 809-819.

40. **Campell, B.R., Song, Y., Posch, T.E., Cullis, C.A. and Town, C.D.** (1992) Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **112**, 225-228.
41. **Cao, X. and Jacobsen, S.E.** (2002a) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16491-16498.
42. **Cao, X. and Jacobsen, S.E.** (2002b) Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol*, **12**, 1138-1144.
43. **Cao, X., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Phillips, R.L., Kaeppler, S. and Jacobsen, S.E.** (2000) Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4979-4984.
44. **Carmell, M.A. and Hannon, G.J.** (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 214-218.
45. **Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E.** (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, **303**, 1336.
46. **Chen, M.W., Anne, J., Volckaert, G., Huysmans, E., Vandenberghe, A. and De Wachter, R.** (1984) The nucleotide sequences of the 5 S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. *Nucleic Acids Res*, **12**, 4881-4892.
47. **Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E. and Fischer, R.L.** (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell*, **110**, 33-42.
48. **Chua, Y.L., Brown, A.P. and Gray, J.C.** (2001) Targeted histone acetylation and altered nuclease accessibility over short regions of the pea plastocyanin gene. *Plant Cell*, **13**, 599-612.

49. **Cihlar, R.L. and Sypherd, P.S.** (1980) The organization of the ribosomal RNA genes in the fungus *Mucor racemosus*. *Nucleic Acids Res*, **8**, 793-804.
50. **Clemens, K.R., Liao, X., Wolf, V., Wright, P.E. and Gottesfeld, J.M.** (1992) Definition of the binding sites of individual zinc fingers in the transcription factor IIIA-5S RNA gene complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10822-10826.
51. **Cloix, C., Tutois, S., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G. and Tourmente, S.** (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res*, **10**, 679-690.
52. **Cloix, C., Tutois, S., Yukawa, Y., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G. and Tourmente, S.** (2002) Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. *Genome Res*, **12**, 132-144.
53. **Cloix, C., Yukawa, Y., Tutois, S., Sugiura, M. and Tourmente, S.** (2003) In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J*, **35**, 251-261.
54. **Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H. and Helin, K.** (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*.
55. **Condon, C., Squires, C. and Squires, C.L.** (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, **59**, 623-645.
56. **Conesa, C., Swanson, R.N., Schultz, P., Oudet, P. and Sentenac, A.** (1993) On the subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation of the yeast transcription factor TFIIC/tau. *J Biol Chem*, **268**, 18047-18052.
57. **Conti, E. and Izaurralde, E.** (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 316-325.
58. **Culbertson, M.R. and Leeds, P.F.** (2003) Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 207-214.

59. **Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C.** (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.
60. **Dangl, M., Brosch, G., Haas, H., Loidl, P. and Lusser, A.** (2001) Comparative analysis of HD2 type histone deacetylases in higher plants. *Planta*, **213**, 280-285.
61. **Darby, M.K., Andrews, M.T. and Brown, D.D.** (1988) Transcription complexes that program Xenopus 5S RNA genes are stable in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5516-5520.
62. **De Veylder, L., de Almeida Engler, J., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G. and Inze, D.** (1999) A new D-type cyclin of Arabidopsis thaliana expressed during lateral root primordia formation. *Planta*, **208**, 453-462.
63. **Dechampesme, A.M., Koroleva, O., Leger-Silvestre, I., Gas, N. and Camier, S.** (1999) Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway. *J Cell Biol*, **145**, 1369-1380.
64. **Denis, H. and le Maire, M.** (1983) Thesaurisomes, a novel kind of nucleoprotein particle. *Subcell Biochem*, **9**, 263-297.
65. **Denis, H., Wegnez, M. and Willem, R.** (1972) [Biochemical research on oogenesis. V. Comparison between somatic 5 S RNA and oocyte 5 S RNA in Xenopus laevis]. *Biochimie*, **54**, 1189-1195.
66. **Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q. and Muegge, K.** (2001) Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev*, **15**, 2940-2944.
67. **Dimitrov, S., Almouzni, G., Dasso, M. and Wolffe, A.P.** (1993) Chromatin transitions during early Xenopus embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. *Dev Biol*, **160**, 214-227.

68. **Dobosy, J.R. and Selker, E.U.** (2001) Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 721-727.
69. **Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Shpanchenko, O., Bogdanov, A. and Brimacombe, R.** (1996) Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA. *RNA*, **2**, 146-152.
70. **Drew, P.D., Nagle, J.W., Canning, R.D., Ozato, K., Biddison, W.E. and Becker, K.G.** (1995) Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to Xenopus TFIIIA. *Gene*, **159**, 215-218.
71. **Earley, K., Lawrence, R.J., Pontes, O., Reuther, R., Enciso, A.J., Silva, M., Neves, N., Gross, M., Viegas, W. and Pikaard, C.S.** (2006) Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes Dev*, **20**, 1283-1293.
72. **Ebbs, M.L. and Bender, J.** (2006) Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell*, **18**, 1166-1176.
73. **Ekwall, K., Nimmo, E.R., Javerzat, J.P., Borgstrom, B., Egel, R., Cranston, G. and Allshire, R.** (1996) Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function. *J Cell Sci*, **109** (Pt 11), 2637-2648.
74. **Ellis, T.H., Lee, D., Thomas, C.M., Simpson, P.R., Cleary, W.G., Newman, M.A. and Burcham, K.W.** (1988) 5S rRNA genes in *Pisum*: sequence, long range and chromosomal organization. *Mol Gen Genet*, **214**, 333-342.
75. **Elmayan, T., Proux, F. and Vaucheret, H.** (2005) Arabidopsis RPA2: a genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr Biol*, **15**, 1919-1925.
76. **Elomaa, P., Helariutta, Y., Griesbach, R.J., Kotilainen, M., Seppanen, P. and Teeri, T.H.** (1995) Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol Gen Genet*, **248**, 649-656.

77. **Emerson, B.M. and Roeder, R.G.** (1984) DNA sequences and transcription factor interactions of active and inactive forms of mammalian 5 S RNA genes. *J Biol Chem*, **259**, 7926-7935.
78. **Engelke, D.R., Ng, S.Y., Shastry, B.S. and Roeder, R.G.** (1980) Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell*, **19**, 717-728.
79. **Fagard, M. and Vaucheret, H.** (2000) (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **51**, 167-194.
80. **Felts, S.J., Weil, P.A. and Chalkley, R.** (1990) Transcription factor requirements for in vitro formation of transcriptionally competent 5S rRNA gene chromatin. *Mol Cell Biol*, **10**, 2390-2401.
81. **Finnegan, E.J. and Dennis, E.S.** (1993) Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2383-2388.
82. **Finnegan, E.J. and Kovac, K.A.** (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol*, **43**, 189-201.
83. **Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8449-8454.
84. **Ford, P.J.** (1971) Non-coordinated accumulation and synthesis of 5S ribonucleic acid by ovaries of *Xenopus laevis*. *Nature*, **233**, 561-564.
85. **Ford, P.J. and Southern, E.M.** (1973) Different sequences for 5S RNA in kidney cells and ovaries of *Xenopus laevis*. *Nat New Biol*, **241**, 7-12.
86. **Foster, M.P., Wuttke, D.S., Radhakrishnan, I., Case, D.A., Gottesfeld, J.M. and Wright, P.E.** (1997) Domain packing and dynamics in the DNA complex of the N-terminal zinc fingers of TFIIIA. *Nat Struct Biol*, **4**, 605-608.
87. **Frank, D., Keshet, I., Shani, M., Levine, A., Razin, A. and Cedar, H.** (1991) Demethylation of CpG islands in embryonic cells. *Nature*, **351**, 239-241.

88. **Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T.C., Torres-Ruiz, R.A. and Jones, G.** (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **13**, 867-876.
89. **Fulnecek, J., Matyasek, R., Kovarik, A. and Bezdek, M.** (1998) Mapping of 5-methylcytosine residues in *Nicotiana tabacum* 5S rRNA genes by genomic sequencing. *Mol Gen Genet*, **259**, 133-141.
90. **Furner, I.J., Sheikh, M.A. and Collett, C.E.** (1998) Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics*, **149**, 651-662.
91. **Gall, J.G., Bellini, M., Wu, Z. and Murphy, C.** (1999) Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol Biol Cell*, **10**, 4385-4402.
92. **Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Chua, N.H.** (1990) *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature*, **346**, 390-394.
93. **Gaskins, C.J. and Hanas, J.S.** (1990) Sequence variation in transcription factor IIIA. *Nucleic Acids Res*, **18**, 2117-2123.
94. **Gaskins, C.J., Smith, J.F., Ogilvie, M.K. and Hanas, J.S.** (1992) Comparison of the sequence and structure of transcription factor IIIA from *Bufo americanus* and *Rana pipiens*. *Gene*, **120**, 197-206.
95. **Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B. and Fischer, R.L.** (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, **124**, 495-506.
96. **Geiman, T.M., Tessarollo, L., Anver, M.R., Kopp, J.B., Ward, J.M. and Muegge, K.** (2001) Lsh, a SNF2 family member, is required for normal murine development. *Biochim Biophys Acta*, **1526**, 211-220.

97. **Gendrel, A.V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V. and Martienssen, R.A.** (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1. *Science*, **297**, 1871-1873.
98. **Genger, R.K., Kovac, K.A., Dennis, E.S., Peacock, W.J. and Finnegan, E.J.** (1999) Multiple DNA methyltransferase genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, **41**, 269-278.
99. **Ginsberg, A.M., King, B.O. and Roeder, R.G.** (1984) Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell*, **39**, 479-489.
100. **Goldsbrough, P.B., Ellis, T.H. and Lomonossoff, G.P.** (1982) Sequence variation and methylation of the flax 5S RNA genes. *Nucleic Acids Res*, **10**, 4501-4514.
101. **Gong, W., Shen, Y.P., Ma, L.G., Pan, Y., Du, Y.L., Wang, D.H., Yang, J.Y., Hu, L.D., Liu, X.F., Dong, C.X., Ma, L., Chen, Y.H., Yang, X.Y., Gao, Y., Zhu, D., Tan, X., Mu, J.Y., Zhang, D.B., Liu, Y.L., Dinesh-Kumar, S.P., Li, Y., Wang, X.P., Gu, H.Y., Qu, L.J., Bai, S.N., Lu, Y.T., Li, J.Y., Zhao, J.D., Zuo, J., Huang, H., Deng, X.W. and Zhu, Y.X.** (2004) Genome-wide ORFeome cloning and analysis of Arabidopsis transcription factor genes. *Plant Physiol*, **135**, 773-782.
102. **Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K.** (2002) ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, **111**, 803-814.
103. **Gottlob-McHugh, S.G., Levesque, M., MacKenzie, K., Olson, M., Yarosh, O. and Johnson, D.A.** (1990) Organization of the 5S rRNA genes in the soybean Glycine max (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome*, **33**, 486-494.
104. **Gowher, H., Leismann, O. and Jeltsch, A.** (2000) DNA of Drosophila melanogaster contains 5-methylcytosine. *EMBO J*, **19**, 6918-6923.
105. **Grellet, F. and Penon, P.** (1984) Chromatin organization and methylation patterns of wheat 5S RNA genes. *Plant Sci Lett*, **37**, 129-136.

106. **Grewal, S.I. and Rice, J.C.** (2004) Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 230-238.
107. **Guddat, U., Bakken, A.H. and Pieler, T.** (1990) Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in xenopus oocytes. *Cell*, **60**, 619-628.
108. **Hall, I.M., Noma, K. and Grewal, S.I.** (2003) RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 193-198.
109. **Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. and Grewal, S.I.** (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, **297**, 2232-2237.
110. **Hallenberg, C., Nederby Nielsen, J. and Frederiksen, S.** (1994) Characterization of 5S rRNA genes from mouse. *Gene*, **142**, 291-295.
111. **Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D.** (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J*, **21**, 4671-4679.
112. **Hanas, J.S., Hocker, J.R., Cheng, Y.G., Lerner, M.R., Brackett, D.J., Lightfoot, S.A., Hanas, R.J., Madhusudhan, K.T. and Moreland, R.J.** (2002) cDNA cloning, DNA binding, and evolution of mammalian transcription factor IIIA. *Gene*, **282**, 43-52.
113. **Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J. and Schar, P.** (2003) The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2261-2271.
114. **Hart, R.P. and Folk, W.R.** (1982) Structure and organization of a mammalian 5 S gene cluster. *J Biol Chem*, **257**, 11706-11711.
115. **He, L. and Hannon, G.J.** (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, **5**, 522-531.
116. **Heitz, E.** (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik*, **69**, 762-818.

117. **Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J. and Bird, A.** (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, **401**, 301-304.
118. **Henikoff, S.** (2000) Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta*, **1470**, 01-8.
119. **Henikoff, S. and Comai, L.** (1998) A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in Arabidopsis. *Genetics*, **149**, 307-318.
120. **Hennig, W.** (1999) Heterochromatin. *Chromosoma*, **108**, 1-9.
121. **Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. and Baulcombe, D.C.** (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, **308**, 118-120.
122. **Hirochika, H., Okamoto, H. and Kakutani, T.** (2000) Silencing of retrotransposons in arabidopsis and reactivation by the ddm1 mutation. *Plant Cell*, **12**, 357-369.
123. **Hock, R., Moorman, A., Fischer, D. and Scheer, U.** (1993) Absence of somatic histone H1 in oocytes and preblastula embryos of *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, **158**, 510-522.
124. **Holmberg, L. and Nygard, O.** (2000) Release of ribosome-bound 5S rRNA upon cleavage of the phosphodiester bond between nucleotides A54 and A55 in 5S rRNA. *Biol Chem*, **381**, 1041-1046.
125. **Honda, B.M. and Roeder, R.G.** (1980) Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation. *Cell*, **22**, 119-126.
126. **Hsieh, Y.J., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R. and Roeder, R.G.** (1999) The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 7697-7704.

127. **Huang, Y. and Maraia, R.J.** (2001) Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2675-2690.
128. **Hung, M.S., Karthikeyan, N., Huang, B., Koo, H.C., Kiger, J. and Shen, C.J.** (1999) Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11940-11945.
129. **Ivanova, A.V., Bonaduce, M.J., Ivanov, S.V. and Klar, A.J.** (1998) The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nat Genet*, **19**, 192-195.
130. **Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T. and Jacobsen, S.E.** (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, **112**, 308-315.
131. **Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X. and Jacobsen, S.E.** (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, **416**, 556-560.
132. **Jacobsen, S.E. and Meyerowitz, E.M.** (1997) Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in arabidopsis. *Science*, **277**, 1100-1103.
133. **Jacobsen, S.E., Sakai, H., Finnegan, E.J., Cao, X. and Meyerowitz, E.M.** (2000) Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in Arabidopsis. *Curr Biol*, **10**, 179-186.
134. **Jarry, B. and Rosset, R.** (1971) Heterogeneity of 5S RNA in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **113**, 43-50.
135. **Jasencakova, Z., Soppe, W.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M. and Schubert, I.** (2003) Histone modifications in Arabidopsis- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J*, **33**, 471-480.

136. **Jeddeloh, J.A., Bender, J. and Richards, E.J.** (1998) The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev*, **12**, 1714-1725.
137. **Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. and Richards, E.J.** (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet*, **22**, 94-97.
138. **Jensen, L.R. and Frederiksen, S.** (2000) The 5S rRNA genes in *Macaca fascicularis* are organized in two large tandem repeats. *Biochim Biophys Acta*, **1492**, 537-542.
139. **Jenuwein, T. and Allis, C.D.** (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
140. **Johnson, L., Cao, X. and Jacobsen, S.** (2002) Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol*, **12**, 1360-1367.
141. **Joho, K.E., Darby, M.K., Crawford, E.T. and Brown, D.D.** (1990) A finger protein structurally similar to TFIIIA that binds exclusively to 5S RNA in *Xenopus*. *Cell*, **61**, 293-300.
142. **Jones, L., Ratcliff, F. and Baulcombe, D.C.** (2001) RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol*, **11**, 747-757.
143. **Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P.** (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, **19**, 187-191.
144. **Jost, J.P., Siegmann, M., Sun, L. and Leung, R.** (1995) Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*, **270**, 9734-9739.
145. **Kakutani, T., Jeddeloh, J.A., Flowers, S.K., Munakata, K. and Richards, E.J.** (1996) Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12406-12411.

146. **Kakutani, T., Munakata, K., Richards, E.J. and Hirochika, H.** (1999) Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **151**, 831-838.
147. **Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M. and Matzke, A.J.** (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet*, **37**, 761-765.
148. **Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M. and Matzke, A.J.** (2004) Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, **14**, 801-805.
149. **Kapoor, A., Agarwal, M., Andreucci, A., Zheng, X., Gong, Z., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Zhu, J.K.** (2005a) Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA-methylation-independent manner in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **15**, 1912-1918.
150. **Kapoor, A., Agius, F. and Zhu, J.K.** (2005b) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett*, **579**, 5889-5898.
151. **Karpen, G.H. and Allshire, R.C.** (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet*, **13**, 489-496.
152. **Kassavetis, G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H. and Geiduschek, E.P.** (1990) *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell*, **60**, 235-245.
153. **Kassavetis, G.A., Joazeiro, C.A., Pisano, M., Geiduschek, E.P., Colbert, T., Hahn, S. and Blanco, J.A.** (1992) The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIB. *Cell*, **71**, 1055-1064.
154. **Kassavetis, G.A., Letts, G.A. and Geiduschek, E.P.** (2001) The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIB participates in two steps of promoter opening. *Embo J*, **20**, 2823-2834.

155. **Kato, M., Miura, A., Bender, J., Jacobsen, S.E. and Kakutani, T.** (2003) Role of CG and Non-CG Methylation in Immobilization of Transposons in Arabidopsis. *Curr Biol*, **13**, 421-426.
156. **Kaya, H., Shibahara, K.I., Taoka, K.I., Iwabuchi, M., Stillman, B. and Araki, T.** (2001) FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*, **104**, 131-142.
157. **Kazan, K.** (2003) Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *Trends Plant Sci*, **8**, 468-471.
158. **Keller, H.J., Romaniuk, P.J. and Gottesfeld, J.M.** (1992) Interaction of Xenopus TFIIC with the TFIIA.5 S RNA gene complex. *J Biol Chem*, **267**, 18190-18198.
159. **Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y., Kinoshita, Y., Cao, X., Jacobsen, S.E., Fischer, R.L. and Kakutani, T.** (2004) One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation. *Science*, **303**, 521-523.
160. **Kishimoto, N., Sakai, H., Jackson, J., Jacobsen, S.E., Meyerowitz, E.M., Dennis, E.S. and Finnegan, E.J.** (2001) Site specificity of the Arabidopsis MET1 DNA methyltransferase demonstrated through hypermethylation of the superman locus. *Plant Mol Biol*, **46**, 171-183.
161. **Kloetzel, P.M., Whitfield, W. and Sommerville, J.** (1981) Analysis of reconstruction of an RNP particle which stores 5S RNA and tRNA in amphibian oocytes. *Nucleic Acids Res*, **9**, 605-621.
162. **Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y.** (2006) The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*.
163. **Knight, E., Jr. and Darnell, J.E.** (1967) Distribution of 5 s RNA in HeLa cells. *J Mol Biol*, **28**, 491-502.
164. **Komiya, H., Shimizu, N., Kawakami, M. and Takemura, S.** (1980) Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from Lingula anatina. A study on the molecular

- p>evolution of 5S ribosomal RNA from a living fossil.
- J Biochem (Tokyo)*
- ,
- 88**
- , 1449-1456.
165. **Korn, L.J.** (1982) Transcription of *Xenopus* 5S ribosomal RNA genes. *Nature*, **295**, 101-105.
 166. **Kovarik, A., Koukalova, B., Lim, K.Y., Matyasek, R., Lichtenstein, C.P., Leitch, A.R. and Bezdek, M.** (2000) Comparative analysis of DNA methylation in tobacco heterochromatic sequences. *Chromosome Res*, **8**, 527-541.
 167. **Kress, C., Thomassin, H. and Grange, T.** (2001) Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett*, **494**, 135-140.
 168. **Kubicek, S. and Jenuwein, T.** (2004) A crack in histone lysine methylation. *Cell*, **119**, 903-906.
 169. **Kundu, T.K., Wang, Z. and Roeder, R.G.** (1999) Human TFIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 1605-1615.
 170. **Kunert, N., Marhold, J., Stanke, J., Stach, D. and Lyko, F.** (2003) A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development*, **130**, 5083-5090.
 171. **Lachner, M., O'Sullivan, R.J. and Jenuwein, T.** (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*, **116**, 2117-2124.
 172. **Larminie, C.G. and White, R.J.** (1998) Identification of a putative BRF homologue in the genome of *Caenorhabditis elegans*. *DNA Seq*, **9**, 49-58.
 173. **Lassar, A.B., Martin, P.L. and Roeder, R.G.** (1983) Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science*, **222**, 740-748.
 174. **Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W. and Pikaard, C.S.** (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell*, **13**, 599-609.

175. **Lee, Y., Erkin, A.M., Van Ryk, D.I. and Nazar, R.N.** (1995) In vivo analyses of the internal control region in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **23**, 634-640.
176. **Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U. and Bestor, T.H.** (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, **71**, 865-873.
177. **Li, J., Li, X., Guo, L., Lu, F., Feng, X., He, K., Wei, L., Chen, Z., Qu, L.J. and Gu, H.** (2006) A subgroup of MYB transcription factor genes undergoes highly conserved alternative splicing in *Arabidopsis* and rice. *J Exp Bot*, **57**, 1263-1273.
178. **Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. and Jacobsen, S.E.** (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, **292**, 2077-2080.
179. **Lindroth, A.M., Shultis, D., Jasencakova, Z., Fuchs, J., Johnson, L., Schubert, D., Patnaik, D., Pradhan, S., Goodrich, J., Schubert, I., Jenuwein, T., Khorasanizadeh, S. and Jacobsen, S.E.** (2004) Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *Embo J*, **23**, 4286-4296.
180. **Lippman, Z., Gendrel, A.V., Black, M., Vaughn, M.W., Dedhia, N., McCombie, W.R., Lavine, K., Mittal, V., May, B., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Doerge, R.W., Colot, V. and Martienssen, R.** (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, **430**, 471-476.
181. **Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T. and Martienssen, R.** (2003) Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol*, **1**, E67.
182. **Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J.** (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441.

183. **Lu, A.L., Steege, D.A. and Stafford, D.W.** (1980) Nucleotide sequence of a 5S ribosomal RNA gene in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Nucleic Acids Res*, **8**, 1839-1853.
184. **Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J.** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
185. **Lusser, A., Brosch, G., Loidl, A., Haas, H. and Loidl, P.** (1997) Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science*, **277**, 88-91.
186. **Lyko, F., Ramsahoye, B.H. and Jaenisch, R.** (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **408**, 538-540.
187. **Malagnac, F., Bartee, L. and Bender, J.** (2002) An Arabidopsis SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *Embo J*, **21**, 6842-6852.
188. **Mao, J., Appel, B., Schaack, J., Sharp, S., Yamada, H. and Soll, D.** (1982) The 5S RNA genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, **10**, 487-500.
189. **Mao, X. and Darby, M.K.** (1993) A position-dependent transcription-activating domain in TFIIIA. *Mol Cell Biol*, **13**, 7496-7506.
190. **Martienssen, R.A.** (2003) Maintenance of heterochromatin by RNA interference of tandem repeats. *Nat Genet*, **35**, 213-214.
191. **Martienssen, R.A. and Colot, V.** (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, **293**, 1070-1074.
192. **Mascia, P.N., Rubenstein, I., Phillips, R.L., Wang, A.S. and Xiang, L.Z.** (1981) Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize. *Gene*, **15**, 7-20.
193. **Mathieu, O.** (2003) Thèse (Th). Implication de mécanismes épigénétiques dans la régulation de la transcription des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*. 197. Génétique Moléculaire. Aubière. n° D.U. 1436

194. **Mathieu, O., Probst, A.V. and Paszkowski, J.** (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *Embo J*, **24**, 2783-2791.
195. **Mathieu, O., Yukawa, Y., Prieto, J.L., Vaillant, I., Sugiura, M. and Tourmente, S.** (2003) Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2424-2433.
196. **Mathieu, O., Yukawa, Y., Sugiura, M., Picard, G. and Tourmente, S.** (2002) 5S rRNA genes expression is not inhibited by DNA methylation in Arabidopsis. *Plant J*, **29**, 313-323.
197. **Matzke, M.A. and Birchler, J.A.** (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, **6**, 24-35.
198. **Matzke, M.A. and Matzke, A.J.** (2004) Planting the seeds of a new paradigm. *PLoS Biol*, **2**, E133.
199. **May, B.P., Lippman, Z.B., Fang, Y., Spector, D.L. and Martienssen, R.A.** (2005) Differential Regulation of Strand-Specific Transcripts from Arabidopsis Centromeric Satellite Repeats. *PLoS Genet*, **1**, e79.
200. **McBryant, S.J., Meier, E., Leresche, A., Sharp, S.J., Wolf, V.J. and Gottesfeld, J.M.** (1996) TATA-box DNA binding activity and subunit composition for RNA polymerase III transcription factor IIIB from Xenopus laevis. *Mol Cell Biol*, **16**, 4639-4647.
201. **McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. and Henikoff, S.** (2000) Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol*, **18**, 455-457.
202. **Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T.** (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, **15**, 185-197.
203. **Melquist, S. and Bender, J.** (2003) Transcription from an upstream promoter controls methylation signaling from an inverted repeat of endogenous genes in Arabidopsis. *Genes Dev*, **17**, 2036-2047.

204. **Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. and Matzke, A.J.** (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J*, **19**, 5194-5201.
205. **Meyer, P., Heidmann, I. and Niedenhof, I.** (1993) Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant J*, **4**, 89-100.
206. **Miller, J., McLachlan, A.D. and Klug, A.** (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, **4**, 1609-1614.
207. **Mittelsten Scheid, O., Afsar, K. and Paszkowski, J.** (1998) Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 632-637.
208. **Mittelsten Scheid, O.M., Probst, A.V., Afsar, K. and Paszkowski, J.** (2002) Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13659-13662.
209. **Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. and Kakutani, T.** (2001) Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, **411**, 212-214.
210. **Modrek, B. and Lee, C.** (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet*, **30**, 13-19.
211. **Molinier, J., Ramos, C., Fritsch, O. and Hohn, B.** (2004) CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 1633-1643.
212. **Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T.** (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6853-6858.

213. **Morel, J.B., Mourrain, P., Beclin, C. and Vaucheret, H.** (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis. *Curr Biol*, **10**, 1591-1594.
214. **Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W. and Petersen-Mahrt, S.K.** (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*, **279**, 52353-52360.
215. **Morse, R.H.** (1989) Nucleosomes inhibit both transcriptional initiation and elongation by RNA polymerase III in vitro. *Embo J*, **8**, 2343-2351.
216. **Morton, D.G. and Sprague, K.U.** (1984) In vitro transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5519-5522.
217. **Motamedi, M.R., Verdel, A., Colmenares, S.U., Gerber, S.A., Gygi, S.P. and Moazed, D.** (2004) Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell*, **119**, 789-802.
218. **Murata, M., Heslop-Harrison, J.S. and Motoyoshi, F.** (1997) Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in Arabidopsis thaliana by multi-color fluorescence in situ hybridization with cosmid clones. *Plant J*, **12**, 31-37.
219. **Murfett, J., Wang, X.J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J.** (2001) Identification of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell*, **13**, 1047-1061.
220. **Murphy, C., Wang, Z., Roeder, R.G. and Gall, J.G.** (2002) RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the Xenopus oocyte nucleus. *Mol Biol Cell*, **13**, 3466-3476.
221. **Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I.** (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.

222. **Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.** (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
223. **Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmeler, K., Hause, G., Aurich, A.C., Dorn, R., Jenuwein, T. and Reuter, G.** (2005) Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. *Embo J*, **24**, 1418-1429.
224. **Neddermann, P., Gallinari, P., Lettieri, T., Schmid, D., Truong, O., Hsuan, J.J., Wiebauer, K. and Jiricny, J.** (1996) Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*, **271**, 12767-12774.
225. **Nelson, D.W., Linning, R.M., Davison, P.J. and Honda, B.M.** (1998) 5'-flanking sequences required for efficient transcription in vitro of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Gene*, **218**, 9-16.
226. **Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A.** (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.
227. **Nielsen, J.N., Hallenberg, C., Frederiksen, S., Sorensen, P.D. and Lomholt, B.** (1993) Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3631-3636.
228. **Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Hoffman, A., Roeder, R.G. and Burley, S.K.** (1996) Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4862-4867.
229. **Nolte, R.T., Conlin, R.M., Harrison, S.C. and Brown, R.S.** (1998) Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2938-2943.
230. **O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D., Schweizer, D. and Jenuwein, T.** (2000) Isolation and

- p>characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression.
- Mol Cell Biol*
- ,
- 20**
- , 9423-9433.
231. **Oettel, S., Hartel, F., Kober, I., Iben, S. and Seifart, K.H.** (1997) Human transcription factors IIIC2 , IIIC1 and a novel component IIIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2440-2447.
 232. **Ogilvie, M.K. and Hanas, J.S.** (1997) Molecular biology of vertebrate transcription factor IIIA: cloning and characterization of TFIIIA from channel catfish oocytes. *Gene*, **203**, 103-112.
 233. **Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O. and Pikaard, C.S.** (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, **120**, 613-622.
 234. **Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W. and Jorgensen, R.A.** (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, **30**, 5036-5055.
 235. **Papa, C.M., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Meeley, R. and Kaeppler, S.M.** (2001) Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. *Plant Cell*, **13**, 1919-1928.
 236. **Parker, C.S. and Roeder, R.G.** (1977) Selective and accurate transcription of the *Xenopus laevis* 5S RNA genes in isolated chromatin by purified RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 44-48.
 237. **Parsons, M.C. and Weil, P.A.** (1990) Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIC. Polypeptide composition defined with polyclonal antibodies. *J Biol Chem*, **265**, 5095-5103.
 238. **Parsons, M.C. and Weil, P.A.** (1992) Cloning of TFC1, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding the 95-kDa subunit of transcription factor TFIIIC. *J Biol Chem*, **267**, 2894-2901.

239. **Paule, M.R. and White, R.J.** (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1283-1298.
240. **Pelham, H.R. and Brown, D.D.** (1980) A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4170-4174.
241. **Pelissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sanger, H.L. and Wassenegger, M.** (1999) Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1625-1634.
242. **Peng, Z. and Bateman, E.** (2004) Analysis of the 5S rRNA gene promoter from *Acanthamoeba castellanii*. *Mol Microbiol*, **52**, 1123-1132.
243. **Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M. and Jenuwein, T.** (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, **107**, 323-337.
244. **Peterson, R.C., Doering, J.L. and Brown, D.D.** (1980) Characterization of two xenopus somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. *Cell*, **20**, 131-141.
245. **Philippsen, P., Thomas, M., Kramer, R.A. and Davis, R.W.** (1978) Unique arrangement of coding sequences for 5 S, 5.8 S, 18 S and 25 S ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* as determined by R-loop and hybridization analysis. *J Mol Biol*, **123**, 387-404.
246. **Picard, B., le Maire, M., Wegnez, M. and Denis, H.** (1980) Biochemical Research on oogenesis. Composition of the 42-S storage particles of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Biochem*, **109**, 359-368.
247. **Picard, B. and Wegnez, M.** (1979) Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: a 5S RNA-protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 241-245.

248. **Pieler, T., Hamm, J. and Roeder, R.G.** (1987) The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell*, **48**, 91-100.
249. **Pieler, T. and Rudt, F.** (1997) Nucleocytoplasmic transport of 5S ribosomal RNA. *Semin Cell Dev Biol*, **8**, 79-82.
250. **Pikaard, C.S.** (2000) The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends Genet*, **16**, 495-500.
251. **Pittman, R.H., Andrews, M.T. and Setzer, D.R.** (1999) A feedback loop coupling 5 S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. *J Biol Chem*, **274**, 33198-33201.
252. **Platero, J.S., Hartnett, T. and Eissenberg, J.C.** (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. *Embo J*, **14**, 3977-3986.
253. **Polakowski, N. and Paule, M.R.** (2002) Purification and characterization of transcription factor IIIA from *Acanthamoeba castellanii*. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1977-1984.
254. **Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E. and Pikaard, C.S.** (2006) The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, **126**, 79-92.
255. **Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. and Lagrange, T.** (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis. *Genes Dev*, **19**, 2030-2040.
256. **Pradhan, S., Cummings, M., Roberts, R.J. and Adams, R.L.** (1998) Isolation, characterization and baculovirus-mediated expression of the cDNA encoding cytosine DNA methyltransferase from *Pisum sativum*. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1214-1222.
257. **Probst, A.V., Fagard, M., Proux, F., Mourrain, P., Boutet, S., Earley, K., Lawrence, R.J., Pikaard, C.S., Murfett, J., Furner, I., Vaucheret, H. and**

- Mittelsten Scheid, O.** (2004) Arabidopsis histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell*, **16**, 1021-1034.
258. **Probst, A.V., Fransz, P.F., Paszkowski, J. and Mittelsten Scheid, O.** (2003) Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J*, **33**, 743-749.
259. **Rae, P.M. and Steele, R.E.** (1978) Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes: an examination of distributions and possible roles, with emphasis on hydroxymethyluracil in dinoflagellates. *Biosystems*, **10**, 37-53.
260. **Rafalski, J.A., Wiewiorowski, M. and Soll, D.** (1982) Organization and nucleotide sequence of nuclear 5S rRNA genes in yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Nucleic Acids Res*, **10**, 7635-7642.
261. **Ramsahoye, B.H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P. and Jaenisch, R.** (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5237-5242.
262. **Razin, A., Webb, C., Szyf, M., Yisraeli, J., Rosenthal, A., Naveh-Many, T., Sciaky-Gallili, N. and Cedar, H.** (1984) Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2275-2279.
263. **Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T.** (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
264. **Reik, W., Dean, W. and Walter, J.** (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, **293**, 1089-1093.
265. **Richards, E.J.** (1997) DNA methylation and plant development. *Trends Genet*, **13**, 319-323.

266. **Rinke, J. and Steitz, J.A.** (1982) Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell*, **29**, 149-159.
267. **Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L. and Wolffe, A.P.** (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, **25**, 338-342.
268. **Rocha, P.S., Sheikh, M., Melchiorre, R., Fagard, M., Boutet, S., Loach, R., Moffatt, B., Wagner, C., Vaucheret, H. and Furner, I.** (2005) The Arabidopsis HOMOLOGUE-DEPENDENT GENE SILENCING1 gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. *Plant Cell*, **17**, 404-417.
269. **Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J. and Dellaporta, S.L.** (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in Arabidopsis. *Science*, **273**, 654-657.
270. **Rosorius, O., Fries, B., Stauber, R.H., Hirschmann, N., Bevec, D. and Hauber, J.** (2000) Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J Biol Chem*, **275**, 12061-12068.
271. **Rosset, R. and Monier, R.** (1963) A propos de la présence d'acide ribosomique de faible poids moléculaire. *Bull Soc Chim Biol*, **46**, 87-109.
272. **Rountree, M.R., Bachman, K.E. and Baylin, S.B.** (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, **25**, 269-277.
273. **Rudt, F. and Pieler, T.** (1996) Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J*, **15**, 1383-1391.
274. **Sakonju, S., Bogenhagen, D.F. and Brown, D.D.** (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell*, **19**, 13-25.

275. **Salzberg, A., Fisher, O., Siman-Tov, R. and Ankri, S.** (2004) Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 465-469.
276. **Santoro, R. and Grummt, I.** (2005) Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 2539-2546.
277. **Schlissel, M.S. and Brown, D.D.** (1984) The transcriptional regulation of *Xenopus* 5s RNA genes in chromatin: the roles of active stable transcription complexes and histone H1. *Cell*, **37**, 903-913.
278. **Schneeberger, R.G., Creissen, G.P. and Cullis, C.A.** (1989) Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, *Linum usitatissimum*. *Gene*, **83**, 75-84.
279. **Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. and Reuter, G.** (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *Embo J*, **21**, 1121-1131.
280. **Schramke, V. and Allshire, R.** (2004) Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 174-180.
281. **Schulman, D.B. and Setzer, D.R.** (2002) Identification and characterization of transcription factor IIIA from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2772-2781.
282. **Seifart, K.H., Wang, L., Waldschmidt, R., Jahn, D. and Wingender, E.** (1989) Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5 S rRNA. *J Biol Chem*, **264**, 1702-1709.
283. **Selker, E.U.** (1998) Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9430-9435.

284. **Selker, E.U., Morzycka-Wroblewska, E., Stevens, J.N. and Metzenberg, R.L.** (1986) An upstream signal is required for in vitro transcription of *Neurospora* 5S RNA genes. *Mol Gen Genet*, **205**, 189-192.
285. **Selker, E.U., Yanofsky, C., Driftmier, K., Metzenberg, R.L., Alzner-DeWeerd, B. and RajBhandary, U.L.** (1981) Dispersed 5S RNA genes in *N. crassa*: structure, expression and evolution. *Cell*, **24**, 819-828.
286. **Sera, T. and Wolffe, A.P.** (1998) Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Mol Cell Biol*, **18**, 3668-3680.
287. **Setzer, D.R. and Brown, D.D.** (1985) Formation and stability of the 5 S RNA transcription complex. *J Biol Chem*, **260**, 2483-2492.
288. **Sharp, P.A.** (1992) TATA-binding protein is a classless factor. *Cell*, **68**, 819-821.
289. **Sharp, S.J. and Garcia, A.D.** (1988) Transcription of the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene requires an upstream promoter and four intragenic sequence elements. *Mol Cell Biol*, **8**, 1266-1274.
290. **Shi, H., O'Brien, C.A., Van Horn, D.J. and Wolin, S.L.** (1996) A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *Rna*, **2**, 769-784.
291. **Shimamura, A., Tremethick, D. and Worcel, A.** (1988) Characterization of the repressed 5S DNA minichromosomes assembled in vitro with a high-speed supernatant of *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cell Biol*, **8**, 4257-4269.
292. **Sibghat, U., Gallinari, P., Xu, Y.Z., Goodman, M.F., Bloom, L.B., Jiricny, J. and Day, R.S., 3rd.** (1996) Base analog and neighboring base effects on substrate specificity of recombinant human G:T mismatch-specific thymine DNA-glycosylase. *Biochemistry*, **35**, 12926-12932.
293. **Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A.** (2001a) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**, 465-476.

294. **Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N. and Kooter, J.M.** (2001b) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol*, **11**, 436-440.
295. **Sims, M.A., Doering, J.L. and Hoyle, H.D.** (1983) DNA methylation patterns in the 5S DNAs of *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res*, **11**, 277-290.
296. **Singer, T., Yordan, C. and Martienssen, R.A.** (2001) Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene Decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev*, **15**, 591-602.
297. **Singh, D. and Ahuja, P.S.** (2006) 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome*, **49**, 91-96.
298. **Smith, R.C., Dworkin-Rastl, E. and Dworkin, M.B.** (1988) Expression of a histone H1-like protein is restricted to early *Xenopus* development. *Genes Dev*, **2**, 1284-1295.
299. **Smith, S. and Stillman, B.** (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell*, **58**, 15-25.
300. **Soppe, W.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M. and Peeters, A.J.** (2000) The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol Cell*, **6**, 791-802.
301. **Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I. and Fransz, P.F.** (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *Embo J*, **21**, 6549-6559.
302. **Sorensen, P.D. and Frederiksen, S.** (1991) Characterization of human 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4147-4151.

303. **Steimer, A., Amedeo, P., Afsar, K., Fransz, P., Scheid, O.M. and Paszkowski, J.** (2000) Endogenous targets of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**, 1165-1178.
304. **Steitz, J.A., Berg, C., Hendrick, J.P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J. and Yario, T.** (1988) A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol*, **106**, 545-556.
305. **Strahl, B.D. and Allis, C.D.** (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
306. **Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A. and Barciszewski, J.** (2002) 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res*, **30**, 176-178.
307. **Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A. and Barciszewski, J.** (2003) 5 S rRNA: structure and interactions. *Biochem J*, **371**, 641-651.
308. **Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Probst, A.V., Angelis, K.J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Mittelsten Scheid, O., Shibahara, K., Scheel, D. and Paszkowski, J.** (2004) BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev*, **18**, 782-793.
309. **Tamaru, H. and Selker, E.U.** (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, **414**, 277-283.
310. **Tariq, M., Saze, H., Probst, A.V., Lichota, J., Habu, Y. and Paszkowski, J.** (2003) Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8823-8827.
311. **Teerawanichpan, P., Chandrasekharan, M.B., Jiang, Y., Narangajavana, J. and Hall, T.C.** (2004) Characterization of two rice DNA methyltransferase genes and RNAi-mediated reactivation of a silenced transgene in rice callus. *Planta*, **218**, 337-349.
312. **Tian, L. and Chen, Z.J.** (2001) Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 200-205.

313. **Tian, L., Fong, M.P., Wang, J.J., Wei, N.E., Jiang, H., Doerge, R.W. and Chen, Z.J.** (2005) Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genome-wide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. *Genetics*, **169**, 337-345.
314. **Tian, L., Wang, J., Fong, M.P., Chen, M., Cao, H., Gelvin, S.B. and Chen, Z.J.** (2003) Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis* histone deacetylase 1 (AtHD1) expression. *Genetics*, **165**, 399-409.
315. **Tompa, R., McCallum, C.M., Delrow, J., Henikoff, J.G., van Steensel, B. and Henikoff, S.** (2002) Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol*, **12**, 65-68.
316. **Tran, R.K., Zilberman, D., de Bustos, C., Ditt, R.F., Henikoff, J.G., Lindroth, A.M., Delrow, J., Boyle, T., Kwong, S., Bryson, T.D., Jacobsen, S.E. and Henikoff, S.** (2005) Chromatin and siRNA pathways cooperate to maintain DNA methylation of small transposable elements in *Arabidopsis*. *Genome Biol*, **6**, R90.
317. **Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G.** (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J*, **13**, 3822-3831.
318. **Turner, B.M.** (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell*, **111**, 285-291.
319. **Tutois, S., Cloix, C., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Lafleuriel, J., Picard, G. and Tourmente, S.** (1999) Structural analysis and physical mapping of a pericentromeric region of chromosome 5 of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res*, **7**, 143-156.
320. **Tutois, S., Cloix, C., Mathieu, O., Cuvillier, C. and Tourmente, S.** (2002) Analysis of 5S rDNA loci among *Arabidopsis* ecotypes and subspecies. *Genome letters*, **3**, 115-122.
321. **Tweedie, S., Ng, H.H., Barlow, A.L., Turner, B.M., Hendrich, B. and Bird, A.** (1999) Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet*, **23**, 389-390.

322. **Vastenhouw, N.L. and Plasterk, R.H.** (2004) RNAi protects the *Caenorhabditis elegans* germline against transposition. *Trends Genet*, **20**, 314-319.
323. **Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I. and Moazed, D.** (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, **303**, 672-676.
324. **Vlachonasios, K.E., Thomashow, M.F. and Triezenberg, S.J.** (2003) Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression. *Plant Cell*, **15**, 626-638.
325. **Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G.L., White, S.A., Teng, G., Martienssen, R.A. and Allshire, R.C.** (2003) RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res*, **11**, 137-146.
326. **Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A.** (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
327. **Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A. and Richards, E.J.** (1993) *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science*, **260**, 1926-1928.
328. **Wada, Y., Ohya, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H.** (2003) Preferential de novo methylation of cytosine residues in non-CpG sequences by a domains rearranged DNA methyltransferase from tobacco plants. *J Biol Chem*, **278**, 42386-42393.
329. **Wagner, I. and Capesius, I.** (1981) Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta*, **654**, 52-56.
330. **Wang, B.B. and Brendel, V.** (2006) Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7175-7180.
331. **Wang, Z. and Roeder, R.G.** (1995) Structure and function of a human transcription factor TFIIB subunit that is evolutionarily conserved and contains both TFIIB- and

- p>high-mobility-group protein 2-related domains.
- Proc Natl Acad Sci U S A*
- ,
- 92**
- , 7026-7030.
332. **Wang, Z. and Roeder, R.G.** (1998) DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell*, **1**, 749-757.
 333. **Warner, J.R.** (2001) Nascent ribosomes. *Cell*, **107**, 133-136.
 334. **Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sanger, H.L.** (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**, 567-576.
 335. **Wegnez, M., Monier, R. and Denis, H.** (1972) Sequence heterogeneity of 5 S RNA in *Xenopus laevis*. *FEBS Lett*, **25**, 13-20.
 336. **Wildeman, A.G. and Nazar, R.N.** (1982) Structural studies of 5 S ribosomal RNAs from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. A comparison of generalized models for eukaryotic 5 S RNAs. *J Biol Chem*, **257**, 11395-11404.
 337. **Wimber, D.E. and Steffensen, D.M.** (1970) Localization of 5S RNA genes on *Drosophila* chromosomes by RNA-DNA hybridization. *Science*, **170**, 639-641.
 338. **Wolffe, A.P.** (1988) Transcription fraction TFIIC can regulate differential *Xenopus* 5S RNA gene transcription in vitro. *EMBO J*, **7**, 1071-1079.
 339. **Wolffe, A.P.** (1989) Dominant and specific repression of *Xenopus* oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H1. *EMBO J*, **8**, 527-537.
 340. **Wolffe, A.P.** (1994) The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5 S RNA gene regulation. *J Cell Sci*, **107** (Pt 8), 2055-2063.
 341. **Wolffe, A.P. and Brown, D.D.** (1986) DNA replication in vitro erases a *Xenopus* 5S RNA gene transcription complex. *Cell*, **47**, 217-227.
 342. **Wolffe, A.P. and Brown, D.D.** (1988) Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science*, **241**, 1626-1632.
 343. **Wolin, S.L. and Cedervall, T.** (2002) The La protein. *Annu Rev Biochem*, **71**, 375-403.

344. **Woodland, H.R., Flynn, J.M. and Wyllie, A.J.** (1979) Utilization of stored mRNA in *Xenopus* embryos and its replacement by newly synthesized transcripts: histone H1 synthesis using interspecies hybrids. *Cell*, **18**, 165-171.
345. **Wormington, W.M., Bogenhagen, D.F., Jordan, E. and Brown, D.D.** (1981) A quantitative assay for *Xenopus* 5S RNA gene transcription in vitro. *Cell*, **24**, 809-817.
346. **Wu, K., Malik, K., Tian, L., Brown, D. and Miki, B.** (2000) Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **44**, 167-176.
347. **Wysocka, J., Milne, T.A. and Allis, C.D.** (2005) Taking LSD 1 to a new high. *Cell*, **122**, 654-658.
348. **Wyszko, E. and Barciszewska, M.** (1997) Purification and characterization of transcription factor IIIA from higher plants. *Eur J Biochem*, **249**, 107-112.
349. **Wyszko, E., Radlowski, M., Bartkowiak, S. and Barciszewska, M.Z.** (1997) Maize TF IIIA--the first transcription factor IIIA from monocotyledons. Purification and properties. *Acta Biochim Pol*, **44**, 579-589.
350. **Xia, R., Wang, J., Liu, C., Wang, Y., Zhai, J., Liu, J., Hong, X., Cao, X., Zhu, J.K. and Gong, Z.** (2006) ROR1/RPA2A, a putative replication protein A2, functions in epigenetic gene silencing and in regulation of meristem development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 85-103.
351. **Xiao, W., Gehring, M., Choi, Y., Margossian, L., Pu, H., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Pennell, R.I. and Fischer, R.L.** (2003) Imprinting of the MEA Polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Dev Cell*, **5**, 891-901.
352. **Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C.** (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, **2**, E104.

353. **Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y.** (2006) JHDM2A, a JmJC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, **125**, 483-495.
354. **Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. and Zhou, M.M.** (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, **426**, 468-474.
355. **Yoder, J.A., Soman, N.S., Verdine, G.L. and Bestor, T.H.** (1997a) DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol*, **270**, 385-395.
356. **Yoder, J.A., Walsh, C.P. and Bestor, T.H.** (1997b) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, **13**, 335-340.
357. **Yoine, M., Ohto, M.A., Onai, K., Mita, S. and Nakamura, K.** (2006) The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. *Plant J*.
358. **Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A. and Muyldermans, S.** (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature*, **395**, 402-405.
359. **Zhu, B., Zheng, Y., Angliker, H., Schwarz, S., Thiry, S., Siegmann, M. and Jost, J.P.** (2000a) 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4157-4165.
360. **Zhu, B., Zheng, Y., Hess, D., Angliker, H., Schwarz, S., Siegmann, M., Thiry, S. and Jost, J.P.** (2000b) 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5135-5139.
361. **Zhu, C.M. and Henney, H.R., Jr.** (1990) DNA methylation pattern during the encystment of *Physarum flavicomum*. *Biochem Cell Biol*, **68**, 944-948.

- 362. Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E.** (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.
- 363. Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E.** (2004) Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol*, **14**, 1214-1220.

Annexe

Article n°4

« Epigenetic mechanisms are involved in the transcriptional regulation of 5S ribosomal DNA in *Arabidopsis thaliana* »

Vaillant, I., Tutois, S. and Tourmente, S. (2004)
Recent Res. Devel. Genet. Breeding, **1**, 413-424.

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Recent Res. Devel. Genet. Breeding, 1(2004): 413-424 ISBN: 81-7736-218-6

24

Epigenetic mechanisms are involved in the transcriptional regulation of 5S ribosomal DNA in *Arabidopsis thaliana*

I. Vaillant, S. Tutois and S. Tourmente

U.M.R. CNRS 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais
63177 Aubière Cedex, France

Abstract

Nuclear genomes of eukaryotes contain hundreds to thousands of genes that encode 5S ribosomal RNAs (5S rRNA). Recent studies, mostly obtained in Arabidopsis, have provided insights in the transcribed and repressed 5S ribosomal DNA (5S rDNA) fractions. An emerging theme from these studies is that epigenetic mechanisms operating at the level of DNA methylation and histone modifications alter the chromatin structure and control the active and inactive 5S rDNA genes.

Correspondence/Reprint request: Dr. S. Tourmente, U.M.R. CNRS 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal
24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France. E-mail: Sylvette.TOURMENTE@geem.univ-bpclermont.fr

Introduction

In eukaryotes, 5S rRNA is a component of the ribosome together with the 28S, 18S, 5.8S rRNAs and ribosomal proteins. Actually very few is known about 5S rRNA function. 5S rRNA is a conserved component of the large ribosomal subunit that is thought to enhance protein synthesis by stabilizing ribosome structure [1]. Experiments in *Xenopus* oocytes have shown that after its transcription the 5S rRNA is first formed as non-ribosomal 7S RNP (TFIIIA-5S rRNA) or ribosomal 5S RNP (L5-5S rRNA) particles which are then exported to the cytoplasm [2,3,4]. Then 5S rRNA re-enters the nucleus to enable the full assembly of the ribosome [5,6]. This nuclear re-entry of 5S rRNA is exclusively mediated by protein L5 [7], the only ribosomal protein binding to the 5S rRNA in eukaryotes [1]. According to Lin and Lin [7], 5S rRNA might be considered to have a chaperone-like behavior. This implies that 5S rRNA participates in the correct folding of the protein L5. Cytoplasmic storage sites for 5S rRNA have been observed neither in somatic mammalian cells [8,9] nor in *Arabidopsis* protoplasts [10], where 5S (L5-5S rRNA) and 7S RNPs would be stored in the nucleolus [10].

Usually in plants (and animal species), the 5S rDNA genes occur in higher copy number than the 18S-5.8S-28S rDNA genes [11,12]. The 5S rDNA arrays are present at one or different chromosomal loci [13]. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiments were usually used to locate 5S rDNA loci, mostly at telomeric and subtelomeric regions [14].

Arabidopsis thaliana is known to contain approximately 1000 copies of 5S rDNA per haploid genome and these occur in tandem arrays [15], localized in the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5 (with a large locus on the left arm and a small locus on the right arm of chromosome 5) in the Columbia ecotype [16,17,18]. In *Arabidopsis thaliana*, two types of 5S rDNA repeated units exist : the major variant with 0.5 kb repeats and one with short repeats (251bp), restricted to the small locus on the right arm of chromosome 5 [19].

5S rDNA FISH experiments have been reported on both mitotic [16] and meiotic *Arabidopsis* chromosomes [17]. By using a 5S rDNA probe, these authors were able to distinguish individual chromosomes and show the polymorphism between different chromosomes. All ecotypes tested possess one large 5S rDNA locus in the short arm of chromosome 4 and a largest one in the left arm of chromosome 5 (Columbia (Col), C24, Cape Verde Islands (Cvi), Kashmir 1 (Kas), Landsberg erecta (Ler), Wassileskija (WS)). Both loci map to the pericentromeric heterochromatin regions of these chromosomes. A small 5S rDNA locus in the right arm of chromosome 5 was detected in Col, C24, Ler and WS and a third large locus in chromosome 3 was detected in some ecotypes (Col, Cvi, Kas and Ler). In Ler, this locus is found in the middle of

the long arm (3L), while it maps to the pericentromeric heterochromatin region of chromosome 3 in Col, Cvi and Kas.

A typical 5S rDNA unit contains a 120 bp Polymerase III transcribed sequence and a non transcribed intergenic spacer. The *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III transcription system is by far the best characterized biochemically, but most of the results obtained on 5S rDNA regulation come from *Arabidopsis*. This review mostly focuses on the regulation aspect.

Presence of 5S array-specific rDNA variants

In *Arabidopsis*, sequence heterogeneity inside each 5S rDNA block differs from one block to another. The more homogeneous 5S rDNA blocks are those on chromosome 4 and left arm of chromosome 5 (the transcribed blocks, see later). Specific mutations, mostly present in the spacer, leading sometimes to new specific restriction sites, are found in each 5S block. The presence of 5S array-specific variants was confirmed with the restriction polymorphism study using YACs mapped at the different 5S rDNA loci of chromosomes 3, 4 and 5 [19].

Polymerase III can recognize a simple cluster of four or more T residues as terminator signals (reviewed in [20]), with this T-stretch located downstream of the 5S rDNA transcribed region. In *A. thaliana*, this T-stretch differs between 5S rDNA units according to their location : chromosome 3, chromosome 4, chromosome 5 large and small blocks. All units from chromosome 4 present a long uninterrupted stretch of T residues (19 up to 21 T). For the units from the other 5S rDNA arrays, this stretch of T residues is always interrupted by motifs which are specific for each locus. Then each 5S rDNA locus can be recognized with this chromosome-specific signature [21].

This T-strech has been studied in 34 ecotypes of *Arabidopsis thaliana* and 4 subspecies of *Arabidopsis*. In most ecotypes, the situation is similar to that observed in Columbia, with a specific T-stretch for the different loci. In the others, the T signature could not be distinguished between the different 5S rDNA loci. Nevertheless, in all these ecotypes and subspecies, the 120bp transcribed region is identical leading to the same major 5S rRNA [22].

5S rDNA transcription

Eukaryotes contain thousands of rDNA genes, and it was suggested that only a fraction of 5S rDNA genes, as well as 45S genes, is active, since the number of rDNA genes far exceeds that normally required to supply ample cytoplasmic rRNAs (reviewed in [23]). Heterogeneity of 5S rRNA transcripts has been reported for a wide range of organisms including bacteria [24], fungi [25,26], echinoderms [27], arthropods [28], amphibia [29], birds and mammals [30]. In *Xenopus*, there is a developmental regulation of expression for the two

families of 5S rDNA [31] and germinating embryos of rice revealed a new 5S-rRNA species compared to resting ones [32].

In *Arabidopsis*, we were interested to know whether the functional 5S rRNAs are indeed homogeneous, or if minor variants corresponding to some or all of the « incorrect » 5S rDNA sequences were transcribed. We could observe that, depending on the developmental stage of the seedling and on the tissue, only the major 5S rRNA (in leaves, stems, siliques, flowers) or both the major and minor 5S rRNA species, containing one or two mutations compared to the major 5S rRNA (2 days-plantlets, roots) are transcribed [21,33]. We could show the presence of minor 5S rRNAs in *Arabidopsis* polysomes [21] as already observed in *E. Coli*, *Xenopus* and *Neurospora* [34]. The comparison of 5S rDNA and 5S rRNA sequences revealed that only two 5S rDNA loci are transcribed : the chromosome 4 locus and the large locus of chromosome 5. These results were confirmed by *in vitro* transcription experiments using nuclear extracts from tobacco [35,36]. Indeed, 5S rDNA units from chromosome 3 and from the small block of chromosome 5 were not transcribed *in vitro*. The presence of numerous mutations in the internal promoter are responsible for this inhibition of transcription [21,37]. There is no need for 5S rDNA units from chromosome 3 since some ecotypes are devoid of these chromosome 3 loci [17] without deleterious effects. On the contrary, all the 5S rDNA units from the large blocks of chromosome 4 and 5 can be transcribed *in vitro*. Then *in vivo* and *in vitro* experiments completely agree and demonstrate that only two 5S rDNA loci are transcribed in the cell : the locus on chromosome 4 and the large locus on chromosome 5. But inside these two blocks, only a fraction of 5S rDNA genes is transcribed *in vivo* with therefore a silencing of the rest of the genes.

Sequences required for transcription of *A. thaliana* 5S rDNA genes

Deletions and point mutations were introduced in an *Arabidopsis* 5S rDNA transcribed region and its 5'- and 3'- flanks in order to analyse their effects on transcription activity. *In vitro* transcription revealed different transcription control regions. One control region essential for transcription initiation was identified in the 5'-flanking sequence. The major sequence determinants were a TATA-like motif (-28 to -23), a GC dinucleotide (-12 to -11), a 3 bp AT-rich region (-4 to -2) and a C residue at -1 (the first base of the transcribed region is the +1). These motifs are important for both accurate transcription initiation and transcription efficiency. Active 5S rDNA transcription additionally required an intragenic promoter composed of an A-box, an Intermediate Element (IE) and a C-box. A stretch of four T is sufficient for transcription termination [37]. In tobacco and tomato, Venkateswarlu *et al.*

[38] have reported the presence of the same motifs found in *Arabidopsis*, although their functionality has not been tested.

Works in other *in vitro* systems have shown that the transcription of 5S rDNA in *Bombyx mori* [39], *Neurospora crassa* [40], *Drosophila melanogaster* [41], human [42,43], nematodes [44] and loach [45] absolutely requires both 5S rDNA transcribed region and 5'-flanking sequences in homologous cell-free extracts. A frequent feature upstream of the transcription initiation site is a conserved TATA sequence, but a 12 bp sequence, designated the D-box, is found in the 5'-flanking region of 5S rDNA genes from hamster and mouse instead of the TATA box [42,43].

The requirement of the 5' flanking region for 5S rDNA transcription seems to be a general phenomenon.

Epigenetic mechanisms are involved in 5S rDNA transcription regulation

5S rDNA loops are present in 3 week-leaves

The absence of transcription of some of the 5S rDNA units from the transcribed 5S blocks (chromosome 4 and chromosome 5 left arm) *in vivo* (although they can be transcribed *in vitro*), strongly suggested epigenetic mechanisms involved in their repression (i. e. changes in gene expression without modifying the sequence).

We therefore studied the 5S rDNA methylation using genomic sequencing, since methylation commonly occurs in heterochromatic repetitive sequences [46,47,48,14], and since plant 5S rDNA was already shown to be methylated using methylation-sensitive restriction endonucleases: maize [49], wheat [50], lupin [51], *Arabidopsis thaliana* [48,52], pea [53] and flax [54]. We found the *A. thaliana* 5S rDNA to be highly methylated at CpG, CpNpG and asymmetrical contexts with a small fraction of 5S rDNA units less methylated [55,56] and supposed to be the transcribed fraction (see later). But *in vitro* transcription of a naked *Arabidopsis* 5S rDNA gene was not impaired by DNA methylation [56], as already observed for a *Xenopus* [57] and a mouse rDNA gene [58], suggesting the requirement for a specific chromatin state for the repression of a subset of 5S rDNA genes in the cell.

FISH with a 5S rDNA probe revealed that in leaf nuclei of 3 weeks wild-type plants, a fraction of 5S rDNA forms loops that emanate from heterochromatic chromocenters, these loops being supposed to be the transcribed fraction. They have euchromatic features such as methylation of the lysine 4 of histone 3 (H3mK4) and acetylation of the lysine 9 of histone 3 (H3AcK9), compared to the heterochromatic status (5-methylcytosine and methylation of lysine 9 of histone 3 (H3mK9)) of the silenced 5S rDNA units co-localizing with the chromocenters. In wild-type 3 weeks leaves, only the

major 5S rRNA is transcribed, therefore only major 5S rDNA genes are supposed to be present in the loops [33]. The involvement of the chromatin structure in the repression of the silent 5S rDNA fraction was confirmed by the results obtained with the *ddm1* mutant. The *DDM1* gene encodes a chromatin remodeling protein [59,60]. The *ddm1* mutation is known to cause a large demethylation of the genome and a striking decondensation of chromocenters [61]. Coherently, consequently to the heterochromatin decondensation, larger 5S rDNA euchromatic loops were observed in *ddm1* 3 weeks leaves, and some 5S rDNA genes derepressed. Therefore, minor 5S rRNAs (containing one or two substitutions compared to the major 5S rRNA) were recovered [33]. Chromatin Immunoprecipitation Experiments (ChIP) have shown that 5S rDNA genes are more associated with H3mK9 (an heterochromatic feature) in wild-type than in the *ddm1* mutant. The opposite pattern was obtained for H3mK4 [33] demonstrating a larger transcribed fraction in *ddm1*. The proportion of minor 5S rRNAs is dependent on the chromatin state, reflected by the methylation state, with an inverse correlation between 5S rDNA methylation and proportion of minor 5S rRNAs.

The only results reported on the influence of the chromatin structure on 5S rDNA transcription were *in vitro* results obtained in *Xenopus*. They have demonstrated a 15-fold enhancement of total 5S rDNA transcription under conditions where acetylation caused the 12-mer nucleosomal arrays to unfold [62] and that nucleosome translational positioning is a major determinant of the binding of TFIIA (the 5S specific transcription factor) to the 5S rDNA genes [63].

Heterochromatin is fully established between days 2 and 4 after germination

The 5S rDNA transcription regulation presented above is observed, with the transcription of the major genes and the repression of the minor ones, in plants older than 4 days. At 2 days after germination, the heterochromatin fraction is much smaller than in 4 days and 3 weeks nuclei. This provides the evidence that the appearance of constitutive heterochromatin is dynamic during *Arabidopsis* development. 5S rDNA loops are not present in 2 days nuclei and both major and minor 5S rDNA genes are transcribed. Heterochromatin formation at chromocenters becomes fully established between days 2 and 4 after germination, accompanied by 5S rDNA loop formation showing methylation of K4 and acetylation of K9 of histone H3 within 5S rDNA loops, as typical for active euchromatin [33]. In the same time, minor 5S rDNA genes become repressed. These results indicate that expression and chromatin organization of 5S rDNA genes change during heterochromatin establishment.

Parallel with PolI epigenetic regulation

It is tempting to make a parallel with the epigenetic regulation of RNA polymerase I transcription, reviewed by [64]. Eukaryotes regulate the effective dosage of their ribosomal RNA (rRNA) genes, expressing fewer than half of the genes at any one time. Ribosomal RNA gene dosage control and nuclear dominance, a phenomenon in which genetic animals and plants hybrids transcribe the rRNA genes inherited from one parent, whereas the rRNA genes of the other parent are inactive [65,66,67], utilize a common mechanism. Central to the mechanism is an epigenetic switch in which concerted changes in promoter cytosine methylation density and specific histone modifications dictate the on and off states of rRNA genes. This regulation could involve a NORc-like activity [68] described by *Santoro et al.* [69]. The nucleolar remodelling complex (NORc) [69], an ATP-dependent chromatin remodelling complex identified in mouse and human cells mediates rRNA gene silencing. NORc seems to coordinate several enzymatic processes, including histone deacetylation and methylation, ATP-dependent chromatin remodelling and DNA methylation to establish a closed chromatin structure and block initiation complex formation.

5S rDNA, PolIII transcribed, and 45S rDNA, PolI transcribed, have both an epigenetic regulation involving histone methylation and (de)acetylation, and DNA methylation. An ATP-dependent chromatin remodelling complex has been identified for 45S rDNA and it is tempting to speculate that activating and repressing complexes enable the 5S rDNA euchromatin and heterochromatin states.

5S Short interfering RNA (siRNA) are produced

Si RNA typically range between 21 and 24 nucleotides [70,71,72]. They are associated with post-transcriptional form of RNA interference (RNAi). They also guide chromatin-based events that result in transcriptional silencing [73]. In *Arabidopsis thaliana*, endogenous siRNAs from repeated sequences corresponding to pericentromeres, transposons and retroelements are relatively abundant [71,74,75]. Heterochromatin in *Arabidopsis* is determined by transposable elements and related tandem repeats, under the control of the chromatin remodelling ATPase DDM1 (Decrease in DNA Methylation). Small interfering RNAs correspond to these sequences suggesting a role in guiding DDM1 [76]. Si RNAs corresponding to 5S rDNA have been identified [75]. Their involvement in the transcriptional regulation of 5S rDNA has not yet been reported.

Conclusion

There is a wealth of informations about the role of the chromatin structure in the regulation of PolIII-mediated transcription. By contrast, the function of

chromatin and DNA-modifying enzymes in PolIII transcriptional regulation is only beginning to be understood.

References

1. Barciszewska, M. Z., M. Szymanski, V. A. Erdmann and J. Barciszewski (2001). "Structure and functions of 5S rRNA." *Acta Biochim Pol* 48(1): 191-8.
2. Guddat, U., A. H. Bakken and T. Pieler (1990). "Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* oocytes." *Cell* 60(4): 619-28.
3. Allison, L.A., North, M.T. and Neville, L.A. (1995). "Differential binding of oocyte-type and somatic-type 5S rRNA to TFIIIA and ribosomal protein L5 in *xenopus* oocytes : specialization for storage versus mobilization.
4. Rinke, J. and J. A. Steitz (1982). "Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies." *Cell* 29(1): 149-59.
5. Steitz, J. A., C. Berg, J. P. Hendrick, H. La Branche-Chabot, A. Metspalu, J. Rinke and T. Yario (1988). "A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells." *J Cell Biol* 106(3): 545-56.
6. Dechampsme, A. M., O. Koroleva, I. Leger-Silvestre, N. Gas and S. Camier (1999). "Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway." *J Cell Biol* 145(7): 1369-80.
7. Lin E, L. S., Lin A. (2001). "The participation of 5S rRNA in the co-translational formation of a eukaryotic 5S ribonucleoprotein complex." *Nucleic Acids Res* 29(12): 2510-2516.
8. Michael, W. M. and G. Dreyfuss (1996). "Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5 S rRNA binding and nucleolar localization." *J Biol Chem* 271(19): 11571-4.
9. Rosorius, O., B. Fries, R. H. Stauber, N. Hirschmann, D. Bevec and J. Hauber (2000). "Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals." *J Biol Chem* 275(16): 12061-8.
10. Mathieu, O., Y. Yukawa, J-L. Prieto, I. Vaillant, M. Sugiura and S. Tourmente (2003). "Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*." *Nucleic Acids Res* 31(9): 2424-33.
11. Appels, R., W.L Gerlach, E.S. Dennis, H. Swift and W.J. Peacock (1980). "Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals". *Chromosoma* 78 : 293-311.
12. Hemleben, V. and D. Werts (1988). "Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*)." *Gene* 62(1): 165-9.
13. Cloix, C., S. Tutois and S. Tourmente (2003a). "5S rDNA AND 5S RNA in higher plants." *Recent Res. Devel. Plant Mol. Biol* 1: 207-221, Research Signpost.
14. Kovarik, A., B. Koukalova, K. Y. Lim, R. Matyasek, C. P. Lichtenstein, A. R. Leitch and M. Bezdek (2000). "Comparative analysis of DNA methylation in tobacco heterochromatic sequences." *Chromosome Res* 8(6): 527-41.

15. Campell, B. R., Y. Song, T. E. Posch, C. A. Cullis and C. D. Town (1992). "Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*." *Gene* 112(2): 225-8.
16. Murata, M., J. S. Heslop-Harrison and F. Motoyoshi (1997). "Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence in situ hybridization with cosmid clones." *Plant J* 12(1): 31-7.
17. Fransz, P., S. Armstrong, C. Alonso-Blanco, T. C. Fischer, R. A. Torres-Ruiz and G. Jones (1998). "Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 13(6): 867-76.
18. Tutois, S., C. Cloix, C. Cuvillier, M. C. Espagnol, J. Lafleurriel, G. Picard and S. Tourmente (1999). "Structural analysis and physical mapping of a pericentromeric region of chromosome 5 of *Arabidopsis thaliana*." *Chromosome Res* 7(2): 143-56.
19. Cloix, C., S. Tutois, O. Mathieu, C. Cuvillier, M. C. Espagnol, G. Picard and S. Tourmente (2000). "Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms." *Genome Res* 10(5): 679-90.
20. Paule, M. R. and R. J. White (2000). "Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III." *Nucleic Acids Res* 28(6): 1283-98.
21. Cloix, C., S. Tutois, Y. Yukawa, O. Mathieu, C. Cuvillier, M. C. Espagnol, G. Picard and S. Tourmente (2002). "Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA." *Genome Res* 12(1): 132-44.
22. Tutois, S., C. Cloix, O. Mathieu, C. Cuvillier and S. Tourmente (2002). "Analysis of 5S rDNA loci among *Arabidopsis* ecotypes and subspecies." *Genome Letters* 1(3): 115-122.
23. Rogers, S. O. and A. J. Bendich (1987). "Ribosomal RNA genes in plants : variability in copy number and in intergenic spacer." *Plant Mol Biol* 9: 509-520.
24. Jarry, B. and R. Rosset (1971). "Heterogeneity of 5S RNA in *Escherichia coli*." *Mol Gen Genet* 113(1): 43-50.
25. Wildeman, A. G. and R. N. Nazar (1982). "Structural studies of 5 S ribosomal RNAs from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. A comparison of generalized models for eukaryotic 5 S RNAs." *J Biol Chem* 257(19): 11395-404.
26. Chen, M. W., J. Anne, G. Volckaert, E. Huysmans, A. Vandenberghe and R. De Wachter (1984). "The nucleotide sequences of the 5 S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny." *Nucleic Acids Res* 12(12): 4881-92.
27. Lu, A. L., D. A. Steege and D. W. Stafford (1980). "Nucleotide sequence of a 5S ribosomal RNA gene in the sea urchin *Lytechinus variegatus*." *Nucleic Acids Res* 8(8): 1839-53.
28. Komiya, H., N. Shimizu, M. Kawakami and S. Takemura (1980). "Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from *Lingula anatina*. A study on the molecular evolution of 5S ribosomal RNA from a living fossil." *J Biochem (Tokyo)* 88(5): 1449-56.
29. Ford, P. and E. Southern (1973). "Different sequences for 5S RNA in kidney cells and ovaries of *Xenopus laevis*." *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
30. Ro-Choi, T. S., R. Reddy, D. Henning and H. Busch (1971). "5S RNA 3 , a new nucleus-specific 5S RNA." *Biochem Biophys Res Commun* 44(4): 963-72.

31. Peterson, R. C., J. L. Doering and D. D. Brown (1980). "Characterization of two *xenopus* somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA." *Cell* 20(1): 131-41.
32. Hariharan, N., P. S. Reddy and J. D. Padayatty (1987). "5S-rRNA genes in rice embryos." *Plant Mol Biol* 9: 443-451.
33. Mathieu, O., Z. Jasencakova, I. Vaillant, A. V. Gendrel, V. Colot, I. Schubert and S. Tourmente (2003). "Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 15(12): 2929-39.
34. Selker, E. U., J. N. Stevens and R. L. Metzenberg (1985). "Heterogeneity of 5S RNA in fungal ribosomes." *Science* 227(4692): 1340-3.
35. Fan, H. and M. Sugiura (1996). "Basal and activated *in vitro* transcription in plants by RNA polymerase II and III." *Methods Enzymol* 273: 268-77.
36. Yukawa, Y., M. Sugita and M. Sugiura (1997). "Efficient *in vitro* transcription of plant nuclear tRNA(Ser) genes in a nuclear extract from tobacco cultured cells." *Plant J* 12(4): 965-70.
37. Cloix, C., Y. Yukawa, S. Tutois, M. Sugiura and S. Tourmente (2003b). "*In vitro* analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes." *Plant J* 35(2): 251-61.
38. Venkateswarlu, K., S. W. Lee and R. N. Nazar (1991). "Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes." *Gene* 105(2): 249-54.
39. Morton, D. G. and K. U. Sprague (1984). "*In vitro* transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(17): 5519-22.
40. Selker, E. U., E. Morzycka-Wroblewska, J. N. Stevens and R. L. Metzenberg (1986). "An upstream signal is required for *in vitro* transcription of *Neurospora* 5S RNA genes." *Mol Gen Genet* 205(1): 189-92.
41. Sharp, S. J. and A. D. Garcia (1988). "Transcription of the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene requires an upstream promoter and four intragenic sequence elements." *Mol Cell Biol* 8(3): 1266-74.
42. Nielsen, J. N., C. Hallenberg, S. Frederiksen, P. D. Sorensen and B. Lomholt (1993). "Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence." *Nucleic Acids Res* 21(16): 3631-6.
43. Hallenberg, C. and S. Frederiksen (2001). "Effect of mutations in the upstream promoter on the transcription of human 5S rRNA genes." *Biochim Biophys Acta* 1520(2): 169-73.
44. Nelson, D. W., R. M. Linning, P. J. Davison and B. M. Honda (1998). "5'-flanking sequences required for efficient transcription *in vitro* of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*." *Gene* 218(1-2): 9-16.
45. Felgenhauer, P., J. Sedman, N. Shostak, M. Timofeeva, A. Lind and A. Bayev (1990). "The 5'-flanking sequence of the loach oocyte 5S rRNA gene contains a signal for effective transcription." *Gene* 90(2): 243-8.
46. Martinez-Zapater JM, M.A. Estelle and C.R. Somerville (1986). "A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*." *Mol Gen Genet* 204: 417-423.

47. Pruitt, R. E. and E. M. Meyerowitz (1986). "Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*." J Mol Biol 187(2): 169-83.
48. Vongs, A., T. Kakutani, R. A. Martienssen and E. J. Richards (1993). "*Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants." Science 260(5116): 1926-8.
49. Mascia, P. N., I. Rubenstein, R. L. Phillips, A. S. Wang and L. Z. Xiang (1981). "Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize." Gene 15(1): 7-20.
50. Grellet, F. and P. Penon (1984). "Chromatin organization and methylation patterns of wheat 5S RNA genes." Plant Science Letters 37: 129-136.
51. Rafalski, J. A., M. Wiewiorowski and D. Soll (1982). "Organization and nucleotide sequence of nuclear 5S rRNA genes in yellow lupin (*Lupinus luteus*)." Nucleic Acids Res 10(23): 7635-42.
52. Finnegan, E. J., W. J. Peacock and E. S. Dennis (1996). "Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development." Proc Natl Acad Sci U S A 93(16): 8449-54.
53. Ellis, T. H., D. Lee, C. M. Thomas, P. R. Simpson, W. G. Cleary, M. A. Newman and K. W. Burcham (1988). "5S rRNA genes in *Pisum*: sequence, long range and chromosomal organization." Mol Gen Genet 214(2): 333-42.
54. Goldsbrough, P. B., T. H. Ellis and G. P. Lomonosoff (1982). "Sequence variation and methylation of the flax 5S RNA genes." Nucleic Acids Res 10(15): 4501-14.
55. Mathieu, O., G. Picard and S. Tourmente (2002a). "Methylation of a euchromatin-heterochromatin transition region in *Arabidopsis thaliana* chromosome 5 left arm." Chromosome Res 10(6): 455-66.
56. Mathieu, O., Y. Yukawa, M. Sugiura, G. Picard and S. Tourmente (2002b). "5S rRNA genes expression is not inhibited by DNA methylation in *Arabidopsis*." Plant J 29(3): 313-23.
57. Besser, D., F. Gotz, K. Schulze-Forster, H. Wagner, H. Kroger and D. Simon (1990). "DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene." FEBS Lett 269(2): 358-62.
58. Santoro, R. and I. Grummt (2001). "Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription." Mol Cell 8(3): 719-25.
59. Jeddelloh, J. A., T. L. Stokes and E. J. Richards (1999). "Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein." Nat Genet 22(1): 94-7.
60. Brzeski, J. and A. Jerzmanowski (2003). "Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors." J Biol Chem 278(2): 823-8.
61. Probst, A. V., P. F. Fransz, J. Paszkowski and O. M. Scheid (2003). "Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin." Plant J 33(4): 743-9.
62. Tse, C., T. Sera, A. P. Wolffe and J. C. Hansen (1998). "Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III." Mol Cell Biol 18(8): 4629-38.
63. Howe, L. and J. Ausio (1998). "Nucleosome translational position, not histone acetylation, determines TFIIIA binding to nucleosomal *Xenopus laevis* 5S rRNA genes." Mol Cell Biol 18(3): 1156-62.
64. Grummt, I. and C. S. Pikaard (2003). "Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription." Nat Rev Mol Cell Biol 4(8): 641-9.

65. Honjo, T. and R. H. Reeder (1973). "Preferential transcription of *Xenopus laevis* ribosomal RNA in interspecies hybrids between *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*." J Mol Biol 80(2): 217-28.
66. Pikaard, C. S. (1999). "Nucleolar dominance and silencing of transcription." Trends Plant Sci 4(12): 478-483.
67. Pikaard, C. S. (2000). "The epigenetics of nucleolar dominance." Trends Genet 16(11): 495-500.
68. Lawrence, R. J., K. Earley, O. Pontes, M. Silva, Z. J. Chen, N. Neves, W. Viegas and C. S. Pikaard (2004). "A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance." Mol Cell 13(4): 599-609.
69. Santoro, R., J. Li and I. Grummt (2002). "The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription." Nat Genet 32(3): 393-6.
70. Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell and D. Baulcombe (2002). "Two classes of short interfering RNA in RNA silencing." Embo J 21(17): 4671-9.
71. Llave, C., K. D. Kasschau, M. A. Rector and J. C. Carrington (2002). "Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants." Plant Cell 14(7): 1605-19.
72. Tang, G., B. J. Reinhart, D. P. Bartel and P. D. Zamore (2003). "A biochemical framework for RNA silencing in plants." Genes Dev 17(1): 49-63.
73. Finnegan, E. J. and M.A. Matzke (2003). "The small RNA world" J Cell Sci 116: 4689-4693.
74. Mette, M. F., J. van der Winden, M. Matzke and A. J. Matzke (2002). "Short RNAs can identify new candidate transposable element families in *Arabidopsis*." Plant Physiol 130(1): 6-9.
75. Xie, Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen and J. C. Carrington (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." PLoS Biol 2(5): E104.
76. Lippman, Z., A. V. Gendrel, M. Black, M. W. Vaughn, N. Dedhia, W. Richard McCombie, K. Lavine, V. Mittal, B. May, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, R. W. Doerge, V. Colot and R. Martienssen (2004). "Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control." Nature 430(6998): 471-6.

Résumé

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes d'ARNr 5S, transcrits par l'ARN polymérase III, sont présents à environ 1000 copies regroupées en blocs situés au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique des chromosomes 3, 4 et 5. Le chromosome 5 porte un locus d'ADNr 5S sur chacun de ses bras. Seuls les loci du chromosome 4 et du bras gauche du chromosome 5 contiennent des gènes d'ARNr 5S transcrits. La population d'ARNr 5S est hétérogène chez *Arabidopsis* et se caractérise par la présence d'un ARNr 5S dit « majoritaire », représentant plus de 90% des transcrits 5S de la cellule, et d'ARNr 5S « minoritaires » différant du transcrit 5S majoritaire par une ou deux substitutions nucléotidiques. Dans le cadre de l'étude de la régulation génétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S, nous avons identifié, cloné et caractérisé TFIIIA d'*Arabidopsis*, qui est le facteur de transcription spécifique des gènes d'ARNr 5S. Lors de cette étude, nous avons également identifié un produit d'épissage alternatif du gène *TFIIIA*, codant une protéine plus courte que TFIIIA dans sa partie N-terminale, dénommée TFIIIAbis. L'analyse de lignées RNAi ciblant TFIIIAbis et des expériences de transcription *in vitro*, ont suggéré que TFIIIAbis aurait un effet positif sur le taux global des ARNr 5S, probablement en stabilisant ces ARN. Nous avons également mené une étude de la régulation épigénétique de l'expression des gènes d'ARNr 5S. Ainsi, nous avons démontré l'implication de la méthylation de l'ADN dans la répression de la transcription des gènes d'ARNr 5S minoritaires. L'expression de ces gènes est également contrôlée par la voie de répression transcriptionnelle indépendante de la méthylation ADN dont MOM1 fait partie. Nous avons identifié un nouveau type de transcrits provenant des gènes d'ARNr 5S, appelés ARNr 5S-210. De la même façon que les ARNr 5S minoritaires, l'expression des ARNr 5S-210 est contrôlée par la méthylation de l'ADN et par la voie de répression contenant MOM1. Enfin, nous montrons que toutes les séquences répétées hétérochromatiques, à l'exception des éléments transposables, sont soumises à ces deux voies de répression.

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, polymerase III-transcribed 5S rRNA genes are present at about 1000 copies clustered at pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4 and 5. The chromosome 5 bears one 5S rDNA locus on each arm. Transcribed 5S rRNA genes are only present on chromosome 4 and in the large locus of left arm of chromosome 5. In *Arabidopsis*, 5S rRNA pool is heterogeneous and characterized by the existence of both a major 5S rRNA (more than 90% of total 5S rRNAs) and some minor 5S rRNAs, differing from the major one by one or two base substitutions. Within the framework of the study of the genetic regulation of the 5S rDNA expression, we have identified, cloned and characterized the transcription factor TFIIIA from *Arabidopsis* that is specific of the 5S genes. We also identified an alternatively spliced product from the *TFIIIA* gene, named TFIIIAbis, that is shorter than TFIIIA in its N-terminal extremity. The data obtained by the targeting of TFIIIAbis by a RNAi technique and *in vitro* transcription experiments, suggest a positive effect of TFIIIAbis on the 5S rRNA global rate, probably by stabilizing these RNA. We also studied the epigenetic regulation of the 5S rDNA demonstrating the implication of DNA methylation in the silencing of minor 5S genes. In addition, MOM1 mediates DNA methylation-independent silencing of these genes. We identified a novel transcript originating from 5S genes, named 5S-210 rRNA. As minor 5S rRNA, the expression of the 5S-210 transcripts is under the control of DNA methylation and of the MOM1 pathway. Finally, we demonstrated that all highly repetitive heterochromatic sequences with the exception of transposable elements are controlled by these two distinct epigenetic silencing pathways.

Mots-clés

Arabidopsis thaliana, ADN ribosomique 5S, TFIIIAbis, méthylation, MOM1, épigénétique.